Marco Antônio Veloso de Albuquerque

**Distrofia muscular de cinturas em crianças:
caracterização clínica, histológica e molecular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Umbertina Conti Reed

Coorientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Albuquerque, Marco Antônio Veloso de

Distrofia muscular de cinturas em crianças : caracterização clínica, histológica e molecular / Marco Antônio Veloso de Albuquerque. -- São Paulo, 2013.

**Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Neurologia.

Orientadora: Umbertina Conti Reed.

Coorientador: Edmar Zanoteli.

Descritores: 1.Distrofias musculares 2.Distrofia muscular do cingulo dos membros/classificação 3.Distrofia muscular do cingulo dos membros/genética 4.Distrofia muscular do cingulo dos membros/patologia 5.Sinais e sintomas 6.Criança 7.Biópsia

USP/FM/DBD-248/13

Dedicatória

À minha família e a todos aqueles
que acreditam no meu trabalho

Agradecimentos especiais

À Prof^a. Dra Umbertina Conti Reed, por ser esta exemplar profissional, tanto na assistência ao paciente como na dedicação à pesquisa e ao ensino e que me recebeu tão bem nesta Universidade, estimulando-me e orientando-me ao longo deste estudo;

Ao Dr. Edmar Zanoteli pela amizade construída e pela orientação no desenvolvimento da metodologia aqui utilizada, me ensinando os primeiros passos das técnicas de biologia molecular com sabedoria e paciência.

Aos meus pais, que sempre prezaram pelo meu estudo e de meus irmãos e, apesar de todas as dificuldades, conseguiram que nós nos tornássemos grandes pessoas e profissionais.

Aos meus irmãos que mesmo distantes, sempre participaram e comemoraram as minhas conquistas.

Aos meus colegas da pós-graduação e da neurologia infantil que me ajudaram no atendimento aos pacientes e apoiaram este estudo.

A Dra. Mary Carvalho e a Dra. Bernadete Resende que me acompanharam desde o início do projeto.

A pesquisadora Jéssica Maximino e a todos do Laboratório LIM45 pela ajuda e contribuição nas diversas etapas deste estudo.

As queridas biólogas Eliene Dutra e Thais, sempre prestativas, e que me ajudaram nos primeiros passos em técnicas laboratoriais.

Aos tantos amigos que fiz durante toda esta jornada desde minha formatura até a conclusão do Doutorado. Amigos do Recife, Porto Alegre e São Paulo que acompanharam meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Marcos Dalgoglio e ao Dr. Luiz Carlos que me ajudaram a superar as adversidades que surgiram durante esta etapa de minha vida.

Aos pacientes, estes sim, os maiores incentivadores à realização deste estudo e que este possa, de alguma forma, beneficiá-los.

A Deus, por me dar força a continuar lutando e superando as adversidades.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências - adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals indexed in Index Medicus*.

A morte do homem começa no instante em que ele desiste de aprender

Albino Teixeira

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE SIGLAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO:	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 Distrofias de cinturas	6
3.1.1 Distrofias de cinturas de herança autossômica recessiva (LGMD2) 10	
3.1.1.1 Sarcoglicanopatias (LGMD 2C, 2D, 2E, e 2F).....	10
3.1.1.2 Calpainopatias (LGMD 2A)	14
3.1.1.4 Teletoninopatias (LGMD2G)	17
3.1.1.5 LGMD2H	18
3.1.1.6 LGMD2I	19
3.1.1.7 LGMD2J	20
3.1.1.8 LGMD2K	21
3.1.1.9 LGMD2L.....	21
3.1.1.10 LGMD2M.....	22
3.1.1.10 LGMD2N	23
3.1.1.11 LGMD2O	23
3.1.2 Distrofias de cinturas de herança autossômica dominante (LGMD1) ..	24
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
4.1 Casuística	27
4.1.1 Caracterização do estudo	27
4.1.2 Pacientes	27
4.1.3 Critérios de inclusão.....	28
4.1.4 Critérios de exclusão.....	28
4.2 MÉTODOS.....	29
4.2.1 Aspectos clínicos.....	29
4.2.2 Exames subsidiários	29
4.2.3 Reações histológicas e histoquímicas na biópsia muscular.....	30
4.2.4 Reações imunoistoquímicas (IH).....	31

4.2.5 Coleta de sangue periférico para estudo molecular	33
4.2.6 Estudo genético das sarcoglicanas	34
4.2.7 Estudo genético do gene FKRP	35
4.2.8 Estudo genético do gene <i>LMNA</i>	37
4.2.9 Estudo genético do gene <i>CAPN3</i>	38
4.2.10 Sequenciamento	40
5. RESULTADOS	41
5.1 Sarcoglicanopatias	44
5.1.1 Aspectos clínicos.....	44
5.1.2 Aspectos histológicos.....	48
5.1.3 Aspectos moleculares	52
5.2 Disferlinopatias (LGMD2B)	53
5.2.1 Aspectos clínicos e histológicos.....	53
5.3 Distrofias de Cinturas por mutação no gene <i>LMNA</i> (LGMD1B).....	55
5.3.1 Aspecto clínico e histológico	55
5.3.2 Aspectos moleculares	57
5.4. Distrofia de cinturas por mutação no gene FKRP (LGMD 2I)	58
5.4.1 Aspectos clínicos.....	58
5.4.2 Aspectos histológicos.....	60
5.4.2 Aspectos moleculares	60
5.5 Calpainopatias (LGMD2A)	61
5.5.1 Aspectos clínicos.....	61
5.5.2 Aspectos histológicos.....	63
5.5.3 Aspectos moleculares	64
5.6 Caveolinopatia (LGMD1C).....	65
5.6.1 Aspectos clínicos e histológicos.....	65
5.7 Fenótipos das distrofias de cinturas sem subtipo definido.....	66
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÕES	85
8- REFERÊNCIAS.....	87
Anexo A- Termo de consentimento livre e esclarecido	101
Anexo B - Aprovação pelo comitê de ética.....	105
Apêndice 1 - Artigo submetido à revista <i>BMC Neurology</i> em 10/07/2013.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do complexo distrofina-glicoproteínas associadas	02
Figura 2: Aspectos clínicos de pacientes com sarcoglicanopatia	47
Figura 3: Aspectos histológicos nas sarcoglicanopatias	51
Figura 4: Aspectos imunoistoquímicos nas sarcoglicanopatias.....	51
Figura 5: Mutações encontradas nos pacientes com sarcoglicanopatia	52
Figura 6: Aspectos clínicos de pacientes com disferlinopatia	54
Figura 7: Aspecto histológico e imunoistoquímico nas disferlinopatias	55
Figura 8: Criança com distrofia muscular de cinturas subtipo 1B: fenótipo, aspectos histológicos e mutação no gene <i>LMNA</i>	57
Figura 9: Aspectos clínicos em criança com LGMD2I	59
Figura 10: Aspectos histológicos na biopsia muscular de paciente com LGMD2I.....	60
Figura 11: Mutações encontradas nos pacientes com LGMD2I	61
Figura 12: Crianças com distrofia muscular de cinturas LGMD2A: fenótipo, aspectos histológicos e mutação no gene <i>CAPN3</i>	62
Figura 13: Aspectos histológicos de biópsias nas calpainopatias	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da distrofia muscular de cinturas adaptada do <i>Gene Table (World Muscle Society)</i>	08
Tabela 2: Anticorpos utilizados no estudo	33
Tabela 3: Pares de oligonucleotídeos usados para amplificar os exons dos genes das sarcoglicanas	35
Tabela 4: Sequência de primers e condições de <i>screening</i> usadas na região codificadora do <i>FKRP</i>	36
Tabelas 5: Pares de oligonucleotídeos usados para amplificar todo o gene <i>LMNA</i>	38
Tabela 6: Pares de oligonucleotídeos usados para amplificar os exons 1, 2, 4, 5,11, 22 do gene <i>CAPN3</i>	39
Tabela 7: Características clínicas, laboratoriais e diagnóstico dos 39 pacientes do estudo.....	43
Tabela 8: Características clínicas em 15 pacientes com sarcoglicanopatia	45
Tabela 9: Achados clínicos em 15 pacientes com sarcoglicanopatia	46
Tabela 10: Exames complementares em 15 pacientes com sarcoglicanopatia	48
Tabela 11: Aspectos histológicos nas sarcoglicanopatias: principais alterações na biópsia muscular	50
Tabela 12: Características clínicas dos pacientes com disferlinopatia	54

Tabela 13: Características clínicas e exames complementares dos pacientes com distrofia de cinturas por mutação no gene <i>LMNA</i>	56
Tabela 14: Características clínicas nos pacientes com distrofia de cinturas tipo 2I	59
Tabela 15: Características clínicas nos pacientes com distrofia de cinturas tipo 2 ^a	63
Tabela 16: Aspectos clínicos e histológicos em pacientes com caveolinopatia	65
Tabela 17: Características clínicas e histológicas em pacientes com distrofia de cinturas sem diagnóstico específico	67

LISTA DE SIGLAS

α -DG: alfa-distroglicana

β -DG: beta-distroglicana

AD: autossômica dominante

ANO5: anoctamina 5

AR: autossômica recessiva

ATPase: adenosina trifosfatase

BM: biópsia muscular

BSA: albumina sérica bovina

CDG: complexo distrofina-glicoproteínas associadas

CK: creatinoquinase

CVF: capacidade vital forçada

DAB: diaminobenzidina

DNA: do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DG: distroglicana

DMAT: Miopatia distal com início tibial anterior

DMC: Distrofia muscular congênita

DMD/DMB: Distrofia muscular de Duchenne/ Distrofia muscular de Becker

ECG: eletrocardiograma

ECO: ecocardiograma

EDMD: Distrofia muscular de Emery-Dreifuss

ENMG: eletroneuromiografia

FKRP: proteína relacionada à fukutina

FM: força muscular

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FSH: Distrofia fácio-escápulo-umeral

GO: Tricômico de Gomori

HE: Hematoxilina & Eosina

IH: imunoistoquímica

LGMD: do inglês, *Limb Girdle Muscular Dystrophy*

LIM: Laboratório de investigação médica

LMNA: lamina A/C

MMII: membros inferiores

MMSS: membros superiores

MRC: do inglês, *medical research council*

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogenase

ORO: Oil red

PAS: Ácido periódico de Schiff

PBS: tampão fosfato salina

PFP: Prova de Função Pulmonar

POMGNT1: Proteína orto-ligada manose beta1,2-N-acetil
glucosaminiltransferase1

POMPT1: Proteína orto manosiltransferase 1

POMPT2: Proteína orto manosiltransferase 2

SCARMD: do inglês, *severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy*

SDH: Succinato desidrogenase

SNC: Sistema Nervoso Central

TRIM32: *Tripartite motif-containing-32*

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitro
μM	micromolar
kDa	kiloDalton
m/s	metros/segundo
Min	minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Ng	nanograma
Pmol	picomolar
U	unidade de medida

RESUMO

Albuquerque, M.A.V. **Distrofia muscular de cinturas em crianças: caracterização clínica, histológica e molecular (Tese)**. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: As distrofias de cinturas representam um grupo de miopatias progressivas, geneticamente determinadas, envolvendo 16 formas de herança autossômica recessiva e oito dominantes, sendo as formas recessivas mais comuns, particularmente em crianças. Caracterizam-se por fraqueza muscular progressiva de predomínio proximal em cinturas escapular e pélvica, existindo desde formas graves de início na infância a formas leves de início em adultos. A biópsia muscular, com estudo histológico e imunoistoquímico, é fundamental para o diagnóstico, porém o exame molecular é o teste padrão ouro para o diagnóstico de certeza. **Objetivos:** Determinar a frequência dos diferentes subtipos de distrofia de cinturas em crianças na nossa população, descrevendo os aspectos clínicos, histológicos e moleculares. **Resultados:** Fizeram parte deste estudo 39 crianças provenientes do ambulatório de doenças neuromusculares do HC-FMUSP, sendo a proporção entre o sexo feminino e masculino de 3:1. A idade de início da doença variou de dois a 13 anos, com média de 7,5 anos. Os sinais e sintomas na apresentação clínica incluíram: quedas frequentes (22 casos), dificuldades em subir escadas (13 casos), marcha digitigrada (2 casos) e dificuldades para se levantar do chão (2 casos). Os níveis de CK foram elevados em todos os pacientes, sendo maiores naqueles com diferlinopatia e algumas formas de sarcoglicanopatias. Dentre os 39 pacientes, 37 foram classificados como LGMD. Destes, 15 (40,5%) receberam o diagnóstico de sarcoglicanopatia (LGMD2C-F), cinco (13,5%) de disferlinopatia (LGMD2B), cinco (13,5%) de calpainopatia, dois (5,5%) de LGMD1B, dois (5,5%) de LGMD2I, um (2,5%) de caveolinopatia (LGMD1A), e em sete (19%) não foi possível identificar o subtipo específico. A biópsia muscular mostrou um padrão distrófico em todos os casos, sendo mais acentuado nas sarcoglicanopatias e na LGMD2I. A presença de inflamação foi incomum na LGMD2B, e a presença de fibras lobuladas foi um achado marcante na LGMD2A. **Conclusões:** O diagnóstico do subtipo específico de LGMD em crianças é um desafio. Este estudo em crianças brasileiras provenientes de um centro de doenças neuromusculares de um grande hospital da rede pública mostrou alta frequência de sarcoglicanopatias, seguida por LGMD2A e LGMD2B. Já a LGMD2I parece ser incomum no Brasil.

Descritores: 1. Distrofias musculares; 2. Distrofia muscular de cinturas/classificação; 3. Distrofia muscular de cinturas/genética; 4. Distrofia muscular de cinturas/patologia; 5. Sinais e sintomas; 6. Criança; 7. Biópsia.

ABSTRACT

Albuquerque, M.A.V. **Limb-Girdle muscular dystrophy in Brazilian children: clinical, histological and molecular characterization** (thesis). "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013".

Background: Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a heterogeneous group of genetic muscular dystrophies, involving 16 autosomal recessive subtypes and eight autosomal dominant subtypes. Autosomal recessive dystrophy is far more common than autosomal dominant dystrophy, particularly in children. The clinical course in this group is characterized by progressive proximal weakness, initially in pelvic and after in shoulder-girdle musculature, varying from very mild to severe degree. Significant overlap of clinical phenotypes, with genetic and clinical heterogeneity, constitutes the rule for this group of diseases. Muscle biopsies are useful for histopathologic and immunolabeling studies, and DNA analysis is the gold standard to establish the specific form of muscular dystrophy. **Objectives:** The aim of this study was to characterize the clinical, histological and molecular aspects in children with LGMD who attend a big public neuromuscular centre in our country to determine the frequency of different forms. **Results:** Thirty seven patients were classified as LGMD and included in this analysis. The study period extended from 2009-2012. The female to male ratio was 3:1. The age of onset ranged from two to 13 years, mean 7,5 years. Onset in the first decade was seen in 90%. The initial clinical signs included: frequent falls (22 cases), difficulty in climbing stairs (13 cases), walk on tip toes (2 cases), difficulty in rising from the floor (2 cases) and difficulty on walking (1 case). The serum CK levels were high in all cases. Among the 37 patients, 15 (40,5%) were classified as sarcoglycanopathies (LGMD2C-F), five (13,5%) as dysferlinopathy (LGMD2B), five (13,5%) as calpainopathy (LGMD2A). Mutations in LMNA gene (LGMD1B), FKR gene (LGMD1) and caveolin gene (LGMD 1C) were identified in two (5,5%), two (5,5%) and one patient (2,5%), respectively. In seven of 37 cases (19%) it was impossible to determine specific diagnosis. Calf hypertrophy, scapular winging and scoliosis were the most characteristic signs in sarcoglycanopathies. In LGMD2I calf hypertrophy is also observed. Atrophy of posterior compartment of thighs is frequent in children with LGMD2B and could suggest the diagnosis. In LGMD2A winging of scapulae and contractures in Achilles tendons were important findings. Muscle biopsy showed a dystrophic pattern in all cases, more intense in sarcoglycanopathies and LGMD2I. Differently from adult's patients, inflammation changes in dysferlinopathies were uncommon. Lobuled fibers were characteristic changes in calpainopathies in children. **Conclusions:** A definitive diagnosis among various subtypes of LGMD in children is challenging. Our series was a large study on LGMD in Brazilian children and showed high frequency of sarcoglycanopathies followed by LGMD2A, LGMD2B, LGMD2I, LGMD1B and LGMD1C.

Descriptors: 1.Muscular dystrophy; 2. Muscular dystrophy Limb-Girdle/classification; 3. Muscular dystrophy Limb-Girdle/genetic; 4.Muscular dystrophy Limb-Girdle/pathology; 5. Child; 6. Biopsy.

1. INTRODUÇÃO:

As distrofias musculares são um grupo heterogêneo de miopatias progressivas, geneticamente determinadas, nas quais há envolvimento primário da musculatura esquelética levando a um quadro de fraqueza muscular, hipotonia, diminuição ou abolição dos reflexos osteotendíneos, bem como atrofia muscular, retrações fibrotendíneas e deformidades esqueléticas. A musculatura respiratória se encontra comprometida em grau variável e, em alguns subtipos, também há comprometimento cardíaco. As distrofias musculares mostram ampla heterogeneidade clínica, existindo desde formas muito graves, rapidamente progressivas, e de início já ao nascimento, a formas leves de início no adolescente ou no adulto com curso lentamente progressivo⁽¹⁻³⁾.

A biopsia muscular mostra, em todas as distrofias musculares, a mesma base patológica caracterizada por variabilidade do calibre das fibras musculares, proliferação de tecido conjuntivo endomisial e perimisial, aumento de núcleos internalizados, presença de necrose em grau variável, macrofagia e aspectos de degeneração com alguma regeneração⁽⁴⁾.

A maioria das distrofias musculares decorre de alterações das proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas associadas (CDG), que interligam a membrana da fibra muscular com a matriz extracelular, a fim de propiciar a estabilidade da fibra muscular para que esta não se rompa durante ciclos repetidos de contração e relaxamento muscular (Figura 1)^(3, 5, 6).

Figura 1: Representação esquemática do complexo distrofina-glicoproteínas associadas e das principais proteínas do sarcolema envolvidas nas distrofias musculares, suas localizações e interações. Adaptada de Mercuri 2013⁽⁶⁾

As distrofias musculares tipo cinturas (sigla internacional LGMD em inglês, de *limb-girdle muscular dystrophy*) representam um grupo heterogêneo de distrofias musculares progressivas decorrentes de diferentes defeitos moleculares que causam deficiência de proteínas nas fibras musculares podendo se manifestar em qualquer idade, mais comumente em adolescentes e adultos jovens, também podendo ocorrer na infância a partir do segundo ano de vida, quando já ocorreu o desenvolvimento da marcha independente (as distrofias musculares de início ao nascimento ou no primeiro ano de vida pertencem à categoria das distrofias musculares congênitas (DMC) e se acompanham de atraso do desenvolvimento motor)⁽⁷⁾. Nas LGMDs a herança pode ser autossômica recessiva ou dominante e clinicamente se caracterizam

por fraqueza muscular progressiva de predomínio proximal, geralmente de início em cintura pélvica e, posteriormente, em cintura escapular, freqüentemente associada a outros sinais clínicos como hipertrofia de panturrilhas, retrações articulares e deformidades esqueléticas, tais como escápula alada e escoliose. A musculatura distal pode ser acometida, mas usualmente apenas tardiamente ao longo da progressão da doença. Envolvimento da musculatura respiratória e da musculatura cardíaca é descrito em muitas das formas da doença. Observam-se diferentes graus de aumento do nível sérico da creatinoquinase (CK) e, esporadicamente, ocorre comprometimento do sistema nervoso central (SNC) e gastrointestinal ⁽⁸⁻¹¹⁾.

Nos últimos 20 anos, com o progresso da genética molecular, inúmeros defeitos genéticos e de suas respectivas deficiências de proteínas em diversas localizações na fibra muscular, têm sido demonstradas. Os genes envolvidos nas LGMDs codificam proteínas do sarcolema, do sarcômero, do envelope nuclear, além de uma variedade de enzimas como a calpaína-3, as glicosiltransferases, estas envolvidas no processo de glicosilação da alfa-distroglicana, e as mutações nos respectivos genes vão definir a etiopatogenia das diferentes formas de LGMD ^(3, 12).

Tem se tornado claro que muitas destas proteinopatias mostram heterogeneidade fenotípica tanto inter como intrafamiliarmente, sendo que o fenótipo da LGMD é considerado a forma de apresentação mais frequente dentre outras possíveis expressões fenotípicas de cada defeito proteico. Em indivíduos de uma mesma família ou de famílias diferentes com a mesma alteração de uma proteína, pode ocorrer um fenótipo típico de LGMD ou apenas demonstrar um comprometimento cardíaco, uma miopatia de

predomínio distal ou até um quadro silencioso ⁽⁷⁾. As razões para esta grande variabilidade de expressão ainda não estão totalmente esclarecidas. Em muitos casos, diferentes fenótipos são causados por diferentes mutações, mas uma mesma mutação pode causar diferentes fenótipos inclusive dentro de uma mesma família ⁽¹³⁾. Penetrância incompleta, expressividade variável, fatores modificando expressão gênica e fatores ambientais podem explicar este fenômeno. Como exemplo, encontramos que mutações no gene lamina A/C (*LMNA*) podem resultar no mesmo fenótipo da distrofia de Emery-Dreyfuss de herança ligada ao X, a LGMD1B que pode apresentar doença cardíaca de condução ou, ainda, em uma forma de distrofia muscular congênita (DMC) com fraqueza cervical; da mesma forma, mutações no gene da disferlina causam três tipos de distrofia muscular: LGMD 2B, miopatia distal Miyoshi e uma forma congênita da disferlinopatia ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

2. OBJETIVOS

Determinar a frequência dos diferentes subtipos de distrofia muscular de cinturas em crianças de uma população proveniente de um grande hospital-escola da rede pública que atende a nível nacional.

Descrever os aspectos clínicos, histológicos e moleculares das diferentes formas de distrofia muscular de cinturas em crianças.

3 - Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Distrofias de cinturas

Desde a sua descrição inicial, as distrofias de cinturas foram agrupadas como doenças musculares genéticas, de amplo espectro clínico e etiologia variada, com a finalidade de diferenciar, de forma mais conveniente, este grupo de pacientes com um quadro clínico em que um diagnóstico preciso não era, ainda, possível de ser realizado, das formas de DMD/DMB e da distrofia fácio-escápulo-umeral⁽¹⁸⁾. A partir da proposta de uma nova nomenclatura em 1995, as síndromes de cinturas que tinham o locus e a proteína deficitária identificadas passaram a integrar a classificação que atualmente é adotada pela *World Muscle Society* e Centro Neuromuscular Europeu (GENE TABLE)⁽¹⁹⁾, sendo que as formas dominantes de síndromes de cinturas foram denominadas LGMD1 e as recessivas LGMD2^(9, 19-27), (Tabela 1). Essa classificação é periodicamente revisada pela *World Muscle Society* e a versão atualizada é disponibilizada eletronicamente nos endereços <http://www.musclegenetable.fr> e <http://194.167.35.195/>.

Cada nova identificação foi recebendo uma letra do alfabeto que em geral obedece à ordem cronológica da identificação a partir da letra A; por exemplo, as sarcoglicanopatias alfa, beta, gama e delta, todas de herança autossômica recessiva, correspondem às LGMD2D, E, C e F, respectivamente. Até o momento existem 24 genes implicados em diferentes formas de LGMD, sendo 16 autossômicas recessivas e oito autossômicas dominantes; estes genes

codificam um grande numero de proteínas envolvidas em todos os aspectos da biologia da célula muscular incluindo a integridade do sarcolema, integridade e função do sarcômero e reparação de membrana. Recentemente, foi identificada uma forma de síndrome de cinturas devida a mutações no gene da distroglicana, proteína de localização trans-sarcolema, na qual até o momento se desconheciam defeitos primários ⁽²⁸⁾. Presentemente, a última LGMD que recebeu uma letra classificatória é a LGMD2Q, causada por mutações no gene da plectina que tem papel fundamental na funcionalidade do músculo esquelético e que já era associada a quadro muscular com epidermólise bolhosa. A LGMD2Q foi descrita em pacientes turcos sem quadro cutâneo: o início pode ser precoce nos primeiros anos de vida e o quadro clínico é grave e progressivo, embora possa mostrar períodos de aparente estabilidade ⁽²⁹⁾.

Tabela 1: Classificação da distrofia muscular de cinturas segundo Gene Table (World Muscle Society) atualizada periodicamente.

Nome da doença/ herança	Herança	Proteína	Símbolo do gene	Cromossomo
LGMD1A	AD	Miotilina	<i>MYOT</i>	5q31
LGMD1B	AD	Lamina A/C	<i>LMNA</i>	1q11-q21
LGMD1C	AD	Caveolina-3	<i>CAV3</i>	3p25
LGMD1D	AD	Homólogo HSP-40, subfamília b, número 6	<i>DNAJB6</i>	7q36
LGMD1E	AD	?		6q23
LGMD1F	AD	?		7q32
LGMD1G	AD	?		4q21
LGMD1H	AD	?		3p23-p25
LGMD2A	AR	Calpaína-3	<i>CAPN3</i>	15q15.1
LGMD2B	AR	Disferlina	<i>DYSF</i>	2p13
LGMD2C	AR	Gama-sarcoglicana	<i>SGCG</i>	13q12
LGMD2D	AR	Alfa-sarcoglicana	<i>SGCA</i>	17q12.q21.33
LGMD2E	AR	Beta-sarcoglicana	<i>SGCB</i>	4q12
LGMD2F	AR	Delta-sarcoglicana	<i>SGCD</i>	5q33

LGMD2G	AR	Teletonina	<i>TCAP</i>	17q12
LGMD2H	AR	<i>Tripartite motif-containing-32</i>	<i>TRIM32</i>	9q31-q34
LGMD2I	AR	Proteína relacionada à fukutina	<i>FKRP</i>	19q13.3
LGMD2J	AR	Titina	<i>TTN</i>	2q31
LGMD2K	AR	Proteína O-manosiltransferase 1	<i>POMT1</i>	9q34
LGMD2L	AR	Anoctamina-5	<i>ANO5</i>	11p14.3
LGMD2M	AR	Fukutina	<i>FKTN</i>	9q31-q33
LGMD2N	AR	Proteína O-manosiltransferase 2	<i>POMT2</i>	14q24
LGMD2O	AR	Proteína O- manose beta-1,2-N-acetil glucosaminiltransferase1	<i>POMGNT1</i>	1p34
LGMD2Q	AR	Plectina	<i>PLEC1</i>	8q24
LGMD com defeito primário na alfa-distroglicana	AR	Distroglicana-1	<i>DAG1</i>	3p21

LGMD: *limb-girdle muscular dystrophy*;

AD: autossômica dominante;

AR: autossômica recessiva

3.1.1 Distrofias de cinturas de herança autossômica recessiva (LGMD2)

3.1.1.1 Sarcoglicanopatias (LGMD 2C, 2D, 2E, e 2F)

O termo, do inglês, *severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy* (SCARMD) foi criado para descrever crianças que apresentavam um fenótipo clínico muito semelhante aos pacientes com DMD, mas com um modo de herança autossômico recessivo e em que se demonstrava que o gene da distrofina era normal. Mutações nos genes que codificam componentes do CDG, e as proteínas da família das sarcoglicanas, foram identificadas como responsáveis por estas doenças ^(10, 30).

Calcula-se que correspondam a cerca de 8 a 25% das síndromes de cinturas e classicamente se caracterizam por um quadro clínico que, embora variável em gravidade e idade de início, manifesta-se em linhas gerais por fraqueza muscular proximal, hipertrofia de panturrilhas, ausência de comprometimento facial, CK por volta de 1000U/l ou mais, e cardiopatia possível, porém não proeminente, sendo mais comum nas formas delta, alfa e gama ^(10, 31, 32). As sarcoglicanopatias alfa, beta, gama e delta (respectivamente LGMD2D, E, C e F) têm seu gene respectivo clonado em 17q, 4q, 13q e 5q, enquanto que o gene da sarcoglicana ϵ , que não se associa a doença muscular, é clonado em 7q. Nos diferentes genes são possíveis variados tipos de mutações, sendo a maioria do tipo *missense* e ocorrendo na parte do gene que codifica o domínio extracelular da sarcoglicana. Não existe correlação clara entre o tipo de mutação e o quadro clínico, sendo a avaliação de tal correlação

complicada pelo fato de que, exceto em populações restritas com alta taxa de consangüinidade e na alfa-sarcoglicanopatia, as mutações não costumam ser recorrentes. Sem dúvida, a mutação num gene específico levando à degradação da sarcoglicana correspondente acaba interferindo na conjugação do complexo todo, ocorrendo um rápido "turnover" da proteína mutante. Existem mutações que são recorrentes, algumas por efeito fundador, por exemplo, da alfa e gama-sarcoglicanopatia de povos ciganos europeus, ou na gama-sarcoglicanopatia do norte da África, ao passo que nas alfa-sarcoglicanopatias há um tipo de mutação que se repete em cerca de 40 a 50% dos pacientes em todo o mundo e outro que se associa a um fenótipo particularmente benigno de intolerância aos esforços ⁽³¹⁻³³⁾.

A alfa-sarcoglicanopatia é provavelmente a mais freqüente e apresenta distribuição universal e ampla variabilidade clínica e de prognóstico ^(31, 34, 35). A média de idade de início é oito anos e meio, variando entre três e 15 anos, com ocasionais relatos em adultos. Embora no início a musculatura pélvica seja a única comprometida, costuma existir escápula alada mais evidente do que numa distrofinopatia nas fases incipientes. Nos casos de início mais precoce ocorre invalidez por volta de 15 anos de idade, mas há ampla variabilidade inter e intrafamiliar. Curiosamente, foi referido recentemente que um menino, com α -sarcoglicanopatia confirmada, apresentava história sugestiva de miopatia metabólica, ou seja, caracterizada por intolerância aos exercícios e mioglobínúria. Tal aspecto atípico, embora raríssimo, foi descrito também em pacientes com DMB ⁽³³⁾ e, mais recentemente, em pacientes com LGMD2I ⁽³⁶⁾.

Outra das mais encontradas é a gama-sarcoglicanopatia, que apresenta uma mutação que leva a uma forma particularmente grave, *Duchenne-like*, em

populações do Norte da África, embora na mesma região geográfica ocorram também outras sarcoglicanopatias, pela alta taxa de consangüinidade dos povos nômades ^(9, 34). Em outros locais a gama-sarcoglicanopatia evolui com a mesma ampla variabilidade clínica que ocorre na alfa-sarcoglicanopatia. Um estudo detalhado de uma família com vários membros acometidos, efetuado no Brasil, revelou que a doença parece ser de início mais precoce e mais rapidamente evolutiva em meninos do que em meninas. Os meninos mostraram média de idade de início de três anos e oito meses e de restrição à cadeira de rodas de 13 anos; entre as meninas a média de idade de início foi de 4.56 anos e a de dependência da cadeira de rodas, 21 anos ⁽³⁵⁾.

A beta-sarcoglicanopatia é amplamente variável. Em populações Amish, homozigotas para diferentes tipos de mutações *missense*, o quadro é leve ou moderado com início em média aos sete anos e meio de idade, ou até em adultos, e acentuada variabilidade intrafamiliar. Entretanto, em outras populações, inclusive no Brasil, foi descrito quadro grave *Duchenne-like* em caso de mutações do tipo *frameshift* (inserção-deleção) ou mesmo *missense*, que englobam o domínio da proteína imediatamente externo à porção transmembrana que parece particularmente implicado na manutenção da estrutura da proteína ^(9, 24).

A delta-sarcoglicanopatia é rara e particularmente grave, tendo sido descrita pela primeira vez no Brasil, associando-se mais freqüentemente a comprometimento cardíaco ⁽³⁴⁾. O início é entre quatro e 10 anos de idade e o óbito é freqüente no fim da segunda década.

O diagnóstico das sarcoglicanopatias através da análise imunoistoquímica da biópsia muscular deve sempre utilizar diferentes

anticorpos, porque já está bem documentado que o déficit total de uma das sarcoglicanas leva, em geral, a déficit total ou parcial das outras^(10, 31). Outro dado importante é que nas sarcoglicanopatias pode ocorrer déficit secundário de distrofina que pode levar a diagnóstico errôneo de DMB, ou de portadora de distrofinopatia, com conseqüências para o aconselhamento genético. Técnicas de Western Blot são muito úteis para detectar qual a sarcoglicana primariamente afetada⁽³⁷⁾.

O diagnóstico molecular das sarcoglicanopatias é difícil e dispendioso. Confirmando o déficit imunoistoquímico, pode-se tentar detectar as mutações mais comuns ou usar métodos de ligação com marcadores polimorfos para o gene da sarcoglicana deficiente em questão ou para mais de um gene. Quando é necessário um diagnóstico de certeza para detectar portadores ou para diagnóstico pré-natal, a análise da mutação acaba dependendo de uma verificação exon a exon, já que há muitos tipos de mutações envolvidas e as mutações recorrentes são habituais apenas nos casos de alfa-sarcoglicanopatia. Além disso, é preciso lembrar que o encontro de mutação nas sarcoglicanopatias, apesar de muito freqüente (cerca de 90% nos déficits totais de alfa-sarcoglicana), não é absoluto quando se empregam as técnicas padronizadas habituais, sendo possível que algumas mutações ocorram em partes do gene não habitualmente analisadas. Devido à intensa correlação das sarcoglicanas entre si e com outras proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas associadas da membrana da fibra muscular, existe, ainda, a possibilidade de que alguns supostos casos de sarcoglicanopatia sejam submetidos inutilmente à trabalhosa procura da mutação por apresentarem

déficit secundário de sarcoglicanas dependente do déficit primário de outra proteína e do gene respectivo ainda não identificado ^(9, 10).

3.1.1.2 Calpainopatias (LGMD 2A)

A síndrome de cinturas LGMD2A corresponde à calpainopatia, ou seja, LGMD calpaína-deficiente, ligada ao locus 15q e que foi descrita em diferentes regiões geográficas, inclusive no Brasil ⁽²⁴⁾. A calpaína 3, músculo-específica, não é cálcio-dependente como as proteínas da mesma família e liga-se com a proteína titina, enorme proteína sarcomérica que provavelmente posiciona os filamentos no centro do sarcômero, protegendo-a da ação catalítica de outras proteases. A interação calpaína-titina pode ser verificada quando se analisa a imunistoquímica de pacientes com alterações do gene da titina em 2q31.

Mutações no gene da titina (titinopatias) causam dois fenótipos diferentes de miopatias congênitas, de herança autossômica dominante: cardiomiopatia dilatada familiar sem miopatia e distrofia muscular tibial de Udd, sem miocardiopatia, que mostra atrofia localizada no compartimento anterior da perna e déficit secundário de calpaína ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

A calpainopatia primária é a síndrome de cinturas mais freqüente em diferentes populações ^(41, 42). No Brasil é freqüente, porém a taxa de ocorrência coincide com a da LGMD2B ⁽³⁴⁾. A doença se associa a muitos tipos diferentes de mutações, *missense*, *nonsense*, deleções e inserções, e há mutações recorrentes, embora poucas, o que torna o estudo molecular dispendioso, trabalhoso, e limitado aos casos em que são necessários o diagnóstico pré-natal e a detecção de portadores. O quadro clínico é amplamente variável com

início entre oito e 15 anos na maioria dos pacientes e extremos entre dois e 40 anos^(9, 20). São características a simetria, a atrofia muscular, a preservação dos abdutores das coxas e o comprometimento da musculatura abdominal, de modo que o paciente mostra acentuada lordose e marcha de base alargada. Retrações aquilianas e deformidades de coluna podem ocorrer precocemente e escápula alada também é comum. A progressão pode ser moderada ou leve, excepcionalmente grave (em pacientes homozigotos para a mutação), e a CK inicialmente é bastante elevada. Há trabalhos que mostram correlação entre a intensidade das alterações histopatológicas e o grau de gravidade do fenótipo⁽⁴³⁾.

O diagnóstico é feito habitualmente por Western Blot de amostras da biópsia muscular, pois os anticorpos gerados até o momento não são aplicáveis para imunistoquímica em cortes de biópsia^(9, 10). As sarcoglicanas e a distrofina mostram marcação normal. Entretanto, em alguns pacientes com LGMD2A, a quantidade da proteína é normal, ocorrendo inativação enzimática. Se tais pacientes tiverem fenótipo característico devem ser encaminhados para diagnóstico molecular ou, ainda, é possível testar a atividade autolítica da enzima no tecido muscular através de métodos específicos⁽⁴⁴⁾. É possível também correlacionar a quantidade da proteína detectada por Western Blot com o fenótipo clínico, embora esta correlação nem sempre ocorra⁽⁴⁵⁾.

Mutações no gene da calpaína foram também encontradas em crianças com quadro de miosite eosinofílica com grau de comprometimento muito variável, alto nível de CK e eventual eosinofilia sanguínea⁽⁴⁶⁾.

3.1.1.3 Disferlinopatias (LGMD2B)

A síndrome de cinturas LGMD2B caracteriza-se pela ausência de disferlina no músculo esquelético. Além do fenótipo de cinturas, dois outros têm sido bem documentados: miopatia de Myoshi e miopatia distal com início tibial anterior (DMAT) ⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾. Recentemente, Paradas et al. descreveram um novo fenótipo em duas crianças com distrofia muscular congênita com fraqueza da cintura pélvica e dos flexores cervicais desde o nascimento, nível normal de CK, biópsia muscular com padrão distrófico moderado e imunomarcagem negativa para a disferlina, nas quais encontrou mutação em homozigose no gene da disferlina em 2p13.3 ⁽¹⁷⁾.

Grande número de variantes clínicas tem sido descritas com espectro amplo de sintomas e idade de início. Embora raras, em certas áreas geográficas, notadamente Oriente Médio e Índia, as disferlinopatias podem ser responsáveis por cerca de 30% das distrofias musculares progressivas de herança autossômica recessiva. No Brasil são tão freqüentes quanto a forma 2A e apresentam um fenótipo discretamente mais benigno ⁽³⁴⁾. Já na Itália, a disferlinopatia é a segunda mais freqüente após a forma 2A ⁽⁴¹⁾.

A disferlina é uma proteína que está envolvida na reparação da membrana e tráfego vesicular e interage provavelmente com importantes vias imunológicas. O gene em 2p12-14 foi primeiramente descrito em 1995 ⁽⁴⁷⁾. Os anticorpos que marcam a proteína deficitária são de fácil aplicação ^(25, 48). Em geral, há altos níveis de CK, o início é tardio, no fim da adolescência e adultos jovens e o quadro clínico é muito lentamente progressivo; embora seja de caráter proximal, compromete precocemente os gastrocnêmios, principalmente

em sua variante alélica que é a miopatia distal de Myoshi, levando a dificuldade para andar na ponta dos pés ^(9, 51). A variante Myoshi, inicialmente descrita no Japão, tornou-se de distribuição universal e apresenta quadro clínico de gravidade variável ⁽⁵¹⁻⁵³⁾. O diagnóstico se baseia na idade de início da doença, nos altos níveis de CK em fase precoce e nas alterações histopatológicas e imunoistoquímicas na biópsia muscular. Existe correlação entre o grau de deficiência da disferlina na biópsia muscular e a gravidade do quadro bem como com a idade de início da sintomatologia ⁽⁵⁴⁾. O diagnóstico molecular está disponível, porém é altamente dispendioso visto que o gene da disferlina possui 55 exons e há cerca de 300 mutações descritas. Um diagnóstico diferencial importante para este tipo de distrofia de cinturas é com a polimiosite, já que pode haver aspectos de inflamação em ambas as formas, e nesta é possível o uso de corticóides e imunossupressores ⁽⁵⁵⁾.

3.1.1.4 Teletoninopatias (LGMD2G)

A síndrome de cinturas LGMD2G foi inteiramente descrita no Brasil, tanto o locus em 17q como a proteína sarcomérica correspondente, a teletonina ^(22, 23, 56). Começa no início da adolescência ou até a segunda década de vida com dificuldades para andar, correr e subir escadas. Os membros superiores são usualmente envolvidos proximalmente enquanto que nos membros inferiores há comprometimento proximal bem como distal. Cerca de 50% dos pacientes podem ter hipertrofia de panturrilhas, enquanto outros podem ter hipotrofia. O nível de CK é moderadamente elevado e o curso da

doença é moderado levando a perda da marcha ao redor da terceira ou quarta década de vida em cerca de 40% dos pacientes. Existe um aspecto anatomopatológico inusitado na biópsia muscular, que é a presença de inúmeros vacúolos anelares que comumente não são encontrados nas outras formas de distrofias de cinturas ^(22, 23, 56).

3.1.1.5 LGMD2H

A síndrome de cinturas LGMD2H, cujo locus é 9q31 e a proteína, Tripartite *motif-containing* 32 (gene TRIM 32), é uma miopatia lentamente progressiva de predomínio proximal com idade de início que varia entre a primeira e a quarta década. Sintomas iniciais podem incluir dor lombar associada com leve fraqueza nos membros inferiores e dificuldades na marcha. Com a progressão, que é lenta, a fraqueza atinge a cintura escapular e a face. Muitos indivíduos conseguem manter a marcha após a quinta década de vida ou mais. Há leve a moderado aumento dos níveis de CK (250 a 4500U/L). Escápula alada, hipertrofia de panturilhas e retração do tendão de Aquiles não são incomuns. A LGMD2H foi originalmente descrita na população Hutterite que reside no Canadá central e nas Dakotas dos EUA ⁽⁵⁷⁾. A mesma mutação no gene TRIM32 resulta também na síndrome "miopatia sarcotubular" que foi descrita histopatologicamente. É de diagnóstico fácil, pois se limita à população da província de Manitoba, Canadá ^(9, 20).

3.1.1.6 LGMD2I

A síndrome de cinturas LGMD2I foi inicialmente descrita na Tunísia, correspondendo a um quadro leve, que acomete crianças e adultos, cursa com CK elevado, hipertrofia muscular, predomínio pélvico e cardiomiopatia eventual⁽²¹⁾. Como o locus da LGMD2I, 19q13.3, é o mesmo da DMC1C, uma forma de distrofia muscular congênita grave associada a mutações do gene FKRP⁽⁵⁸⁾, Brockington et al. investigaram se as duas formas de distrofia seriam alélicas e de fato encontraram mutações no mesmo gene, tornando-se esta LGMD a primeira a ser classificada como alfa-distroglicanopatia^(58, 59).

A FKRP é uma glicosiltransferase que está envolvida no processo de glicosilação da alfa-distroglicana. Mutações *missense*, *nonsense* e inserção/deleção têm sido relatadas em grande número de pacientes com distrofias de cinturas tipo 2I. Muitas destas mutações são raras, sendo a mais freqüente a 826 C>A⁽⁶⁰⁾. Embora o curso seja relativamente benigno, existe um espectro de gravidade clínica que depende da idade de início. Pacientes com início precoce, ou seja, nos primeiros anos de vida, mostram um curso grave, *Duchenne-like*, deixando de deambular no decorrer da segunda década⁽⁶¹⁾. Distúrbio respiratório restritivo primário e envolvimento cardíaco têm sido relatados com diferentes formas e graus de intensidade. A hipertrofia muscular constitui um aspecto marcante, predomina nas panturrilhas, e pode afetar também coxas e língua^(60, 61). Pacientes com idade de início mais tardio mostram um fenótipo heterogêneo, também com hipertrofia muscular, podendo manter a marcha independente até a quinta década da vida. O nível sérico de CK é geralmente elevado.

Schwartz et al.⁽⁶¹⁾, em 102 pacientes com suspeita inicial de distrofia de Duchenne ou Becker que apresentavam resultados negativos para deleção ou duplicação no gene da distrofina, encontraram mutação no gene FKRP em 13 (12,7% dos casos). Isto sugere que um substancial número de pacientes com fenótipo sugestivo de Duchenne e Becker pode ter uma LGMD e devem ser testados para mutação do gene FKRP, caso o exame molecular para pesquisa de deleções ou duplicações no gene da distrofina não identifique a mutação. No Brasil já existem estudos que mapearam o gene FKRP em famílias, demonstrando os tipos de mutações⁽⁶²⁾.

3.1.1.7 LGMD2J

A síndrome de cinturas LGMD2J cujo gene encontra-se em 2q24.3, refere-se ao defeito da titina que se liga à calpaína 3, músculo-específica, a qual a protege da ação catalítica de outras proteases. A titina é uma enorme proteína que provavelmente posiciona os filamentos no centro do sarcômero. As mutações no gene da titina podem causar: cardiomiopatia dilatada familiar sem miopatia, de herança autossômica dominante, distrofia muscular tibial de Udd, de herança autossômica dominante e início em adultos, que cursa com atrofia localizada no compartimento anterior da perna, sem miocardiopatia, e LGMD 2J, de herança autossômica recessiva, grave, com início em adultos ou, mais raramente, na primeira década. Na mesma família podem coexistir os fenótipos tipo cinturas e com comprometimento distal⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

3.1.1.8 LGMD2K

Dincer et al.⁽⁶³⁾ relataram sete pacientes de seis famílias turcas com consangüinidade e oito pacientes ingleses, todos sem história familiar, que manifestaram um quadro lentamente progressivo de síndrome de cinturas, com início entre um e seis anos de idade, CK elevada, discreta hipertrofia muscular, microcefalia e deficiência mental, porém com neuroimagem normal. A biópsia muscular mostrou padrão distrófico com hipoglicosilação da alfa-DG, o que levou posteriormente, em alguns destes pacientes, ao encontro de mutações no gene POMT1 que até o momento tinha sido associado somente com a síndrome de Walker-Warburg ⁽⁶⁴⁾. Portanto, a LGMD2K também é uma alfa-distroglicanopatia.

3.1.1.9 LGMD2L

Recentemente, mutações recessivas no gene da anoctamina 5 (ANO5) foram identificadas como causa de uma forma autossômica recessiva de LGMD associada com assimetria de quadríceps femoral e atrofia de bíceps braquial, que foi classificada como LGMD2L. O gene foi mapeado no cromossomo 11(11p14) em um grupo de famílias franco-canadenses e também em um grupo de pacientes com quadro de atrofia distal que não possuíam mutações no gene da disferlina ^(65, 66). Hicks et al. ⁽⁶⁷⁾ rastream um grupo de 64 pacientes provenientes de 59 famílias britânicas e alemãs e encontraram uma mutação truncada, c-191dupA no exon 5 do gene da anoctamina em 20

pacientes, sendo 15 em homozigose e cinco em heterozigose composta. As características clínicas destes pacientes correspondem a início entre 20 e 50 anos de idade, quadro de fraqueza lentamente progressiva de predomínio em região proximal nos membros inferiores, associada frequentemente à atrofia muscular assimétrica de quadríceps e a altos níveis de CK (maiores que 4500U/L). Os pacientes geralmente mantêm a deambulação por longo período. Apresentação com fraqueza distal é muito menos comum, porém um leve grau de fraqueza distal é observado frequentemente. Os membros superiores geralmente são afetados de forma leve e não há comprometimento cardíaco ou respiratório. Mulheres parecem ser menos frequentemente afetadas.

3.1.1.10 LGMD2M

Godfrey et al. ⁽⁶⁸⁾ descreveram três crianças de duas famílias, com idades variando entre quatro e 10 anos, que apresentavam hipotonia desde o primeiro ano de vida, porém não ao nascimento. A análise imunoistoquímica da biópsia muscular mostrava intensa hipoglicosilação da alfa-DG. Em duas das crianças, a fraqueza muscular instalou-se após um processo febril e na terceira piorou nitidamente aos três anos de idade após um quadro gripal. Todas as crianças apresentavam hipertrofia dos membros inferiores e aumento do nível de CK. A inteligência e a neuroimagem foram normais. Na biópsia muscular, além do padrão distrófico, notava-se discreta infiltração macrofágica, motivo pelo qual se iniciou corticoterapia que foi benéfica. A pesquisa genética levou à primeira descrição de doença muscular causada por mutações do gene da

fukutina, que não é a doença de Fukuyama, causada pela mutação ancestral clássica da população japonesa e associada com alterações clínicas ou estruturais do SNC. Portanto, a LGMD2M também é uma alfa-distroglicanopatia.

3.1.1.10 LGMD2N

Biancheri et al. em 2007 ⁽⁶⁹⁾ descreveram uma paciente com inteligência normal e síndrome de cinturas com pequeno comprometimento clínico, porém alto nível sérico de CK. A biópsia muscular mostrou padrão distrófico e inflamatório, além de acentuada redução da alfa-distroglicana na análise imunohistoquímica, o que levou ao estudo molecular dos genes das glicosiltransferases já conhecidos, tendo-se encontrado mutação no gene *POMT2* e sendo, portanto caracterizada uma nova forma de cinturas classificada como alfa-distroglicanopatia.

3.1.1.11 LGMD2O

Clement et al. em 2008 ⁽⁷⁰⁾ descreveram um paciente com quadro fenotípico compatível com distrofia de cinturas, idade de início aos 12 anos, miopia grave, inteligência normal e diminuição de marcação de alfa-distroglicana na imunohistoquímica da biópsia muscular. Neste paciente foi identificada uma mutação *missense* em homozigose no gene da glicosiltransferase *POMGNT1* (c.1666G>A, p.Asp556Asn), diagnosticando-se

assim mais uma alfa-distroglicanopatia causando quadro de distrofia de cinturas sem deficiência mental.

Em conclusão, o espectro clínico das alfa-distroglicanopatias ficou bastante ampliado pela inclusão destes diferentes tipos de LGMD: 2I, 2K, 2M, 2N e 2O.

3.1.2 Distrofias de cinturas de herança autossômica dominante (LGMD1)

As síndromes de cinturas de herança autossômica dominante correspondem a cerca de 10% do total, embora alguns casos possam ser na realidade formas de distrofia fácio-escápulo-umeral (FSH) com pouco comprometimento facial e muito comprometimento pélvico. Atualmente, com o diagnóstico molecular disponível para a forma FSH, o diagnóstico diferencial simplificou-se. A maioria cursa com níveis de CK menos alterados do que nas formas recessivas. Atualmente oito subtipos já tiveram locus identificado sendo classificadas como: LGMD1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G e 1H.

A LGMD 1A, miotilinopatia, é o fenótipo mais comum associado a mutações no gene da miotilina, este mapeado em 5q. A miotilina está associada com o disco-Z no sarcômero e é expressa no músculo esquelético e em menor grau no músculo cardíaco. O início do quadro varia entre 27 e 77 anos e tem curso lentamente progressivo ⁽⁷¹⁾. O primeiro sintoma usualmente é fraqueza nos membros inferiores, inicialmente proximal e depois distal. Fraqueza facial e flexores do pescoço, disartria, disfonia e retrações articulares também têm sido descritos. Em 50% dos pacientes pode haver cardiopatia. Os níveis de CK geralmente são elevados, entre um e 15 vezes o valor normal,

mas podem ser normais ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. É própria de adultos de populações do norte da África ⁽²⁵⁾.

A LGMD1B, causada por mutações no gene LMNA, cujo locus é 1q11, se inicia, em geral, entre quatro e 38 anos de idade, na metade dos casos durante a primeira década, inicialmente com fraqueza simétrica nos membros inferiores e posteriormente nos superiores e, embora pouco progressiva do ponto de vista da fraqueza, associa-se com grave comprometimento cardíaco tais como arritmias, bradicardia e bloqueio átrio-ventricular a partir dos 25 anos de idade, daí advindo a possibilidade de morte súbita caso não seja implantado marcapasso cardíaco. Os níveis de CK frequentemente são normais e a biópsia muscular mostra somente leves alterações miopáticas com estudo imunoistoquímico muitas vezes evidenciando marcação normal da proteína lamina ao redor da membrana nuclear ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾; é alélica da forma dominante da distrofia de Emery-Dreyfuss, que se apresenta com um quadro de fraqueza envolvendo cinturas e músculos peroneais sendo de início mais precoce, geralmente ao redor dos três aos seis anos de idade, associado a aparecimento precoce de contraturas em cotovelos e espinha rígida. Nesta forma também há comprometimento cardíaco importante, usualmente ocorrendo entre a segunda e a quarta década de vida, que inclui defeitos de condução, arritmias e cardiomiopatia restritiva ou dilatada, requerendo a implantação de marcapasso ou transplante cardíaco ^(78, 79). Na LGMD1B, diferentemente, as retrações de cotovelos, aquileus e espinhais são pouco freqüentes, mais leves e mais tardias. Mais recentemente, também associado ao gene da lamina A/C, foi descrito um fenótipo peculiar, próprio de lactentes, sendo, portanto, classificado como DMC ⁽¹⁵⁾.

A LGMD1C, cujo gene é localizado em 3p25, codifica a caveolina-3, principal componente das cavéolas que são invaginações vesiculares da membrana celular, implicadas em várias funções ^(80, 81). Caracteriza uma miopatia de início na infância (por volta de cinco anos de idade), com fraqueza muscular proximal leve ou moderada, hipertrofia de panturrilhas, câibras pós-exercício, CK moderadamente elevada e curso geralmente pouco progressivo, porém variável; há diferentes mutações descritas e é passível de diagnóstico imunoistoquímico ⁽⁸²⁾. Posteriormente, fenótipos alélicos, foram descritos no locus da caveolina-3: hipercreatinoquinase assintomática em crianças, miopatia distal desde a adolescência e um curioso quadro denominado *rippling* ^(82, 83); este tem início em crianças ou adolescentes, cursa com rigidez muscular, câibras exercício-induzidas, ondulação muscular contínua induzida por percussão muscular, leve fraqueza, hipertrofia de panturrilhas e CK elevada. A biópsia mostra hipertrofia de fibras e núcleos localizados centralmente.

Na LGMD1D os pacientes apresentam fenótipos semelhantes com início da fraqueza em musculatura pélvica entre a quarta e a sexta década de vida, levando a dificuldade na marcha ao redor da oitava década com envolvimento tardio da cintura escapular. A biópsia muscular mostra padrão miopático e/ou distrófico e o estudo genético mostra mutações no gene *DNAJB6* (7q36) que codifica o produto proteico HSP-40 homólogo, número 6 da subfamília B que protege diversas proteínas da agregação irreversível durante a síntese ou em fases de estresse celular ⁽⁸⁴⁾.

Finalmente, as formas, 1E, 1F, 1G e 1H ocorrem em adultos e, embora mapeadas, não têm, ainda, a proteína identificada ^(25, 85).

4 - Casuística e Métodos

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Caracterização do estudo

Este estudo foi do tipo descritivo, sendo caracterizado como série de casos, e foi desenvolvido no Ambulatório de Doenças Neuromusculares da Divisão de Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da FMUSP e nos Laboratórios LIM 15 e 45 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-FMUSP no período de setembro de 2009 até dezembro de 2012. Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética do HCFMUSP.

4.1.2 Pacientes

Fizeram parte deste estudo pacientes de ambos os sexos e com idade variando do segundo ano da vida até 18 anos de idade (faixa etária pertinente ao atendimento no Serviço de Neurologia Infantil), e que estão em acompanhamento clínico regular no Ambulatório de Doenças Neuromusculares da Divisão de Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da FMUSP com o diagnóstico de distrofia muscular de cinturas, o qual foi estabelecido de acordo com as características fenotípicas e com os achados da biópsia muscular. Todos os pacientes tiveram o termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos responsáveis legais.

4.1.3 Critérios de inclusão

- Início da sintomatologia notado após um período de desenvolvimento motor normal, inclusive quanto à aquisição da marcha independente (até 16 meses de idade), e até 17 anos, 11 meses e 29 dias de idade.

- Biópsia muscular apresentando padrão distrófico inespecífico e análise imunoistoquímica normal para a proteína distrofina.

4.1.4 Critérios de exclusão

- Sintomatologia notada ao nascimento, no primeiro ano de vida, ou anteriormente à aquisição da marcha.

- Fraqueza comprometendo exclusivamente as porções distais dos membros.

- Evolução clínica não progressiva.

- Biópsia muscular normal ou com alterações estruturais específicas (tipo central-core, nemalínica, centralização nuclear, alterações mitocondriais, vacúolos com material de depósito anormal, etc.).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Aspectos clínicos

Foram analisados os seguintes dados: idade, sexo, heredograma, idade por ocasião do início da sintomatologia e evolução. Ao exame físico/neurológico foram verificadas a distribuição da fraqueza muscular e da atrofia, a presença ou ausência de comprometimento da musculatura craniofacial, alterações do tônus muscular e dos reflexos profundos, presença de alterações em outros sistemas neurológicos tais como sensibilidade, coordenação e cognição. Foi avaliada a presença de alterações osteoesqueléticas tais como retrações musculares, deformidade de coluna e dismorfismos craniofaciais.

4.2.2 Exames subsidiários

Foram incluídos na avaliação dos pacientes os seguintes exames subsidiários realizados previamente e/ou durante o seguimento clínico: Eletrocardiograma (ECG), Ecocardiograma (ECO), Holter, prova de função pulmonar (PFP), eletroneuromiografia (ENMG) e dosagem sérica de CK.

4.2.3 Reações histológicas e histoquímicas na biópsia muscular

Os pacientes foram submetidos à biópsia muscular apenas uma vez, por ocasião do diagnóstico. Em todos os pacientes, a biópsia muscular foi realizada no músculo bíceps braquial, sob anestesia geral e/ou local. Nas famílias onde havia mais de um indivíduo acometido a biópsia foi realizada em apenas um afetado. Imediatamente após sua remoção, os fragmentos musculares foram montados em cortiça usando *tissue tek*, e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Os fragmentos musculares foram submetidos a cortes coronais seqüenciais em criostato a uma temperatura de -25°C com uma espessura de 6 a 8 micras. As lâminas foram estocadas a -80°C para uso posterior. As lâminas com os fragmentos musculares foram submetidas às colorações histológicas de hematoxilina & eosina (HE) e tricrômio de Gomori modificado (GO), ácido periódico de Schiff (PAS) e “oil red” O (ORO) a fim de avaliar o aspecto global da morfologia muscular, presença de infiltrado conjuntivo-gorduroso, necrose muscular e presença de depósito de material PAS-positivo e de gordura. As reações histoquímicas NADH-tetrazolium redutase (NADH), succinato desidrogenase (SDH) e adenosina trifosfatase (ATPase) em diferentes pHs (9.4 e 4.3) foram realizadas para avaliar o aspecto geral da arquitetura interna das fibras, a atividade oxidativa e a distribuição dos diferentes tipos de fibras. As biópsias musculares de todos os pacientes foram avaliadas para registrar os seguintes aspectos: variabilidade de tamanho das fibras, proliferação do tecido conectivo endomisial e perimisial, deposição de tecido adiposo, aspectos de degeneração (necrose) e de regeneração e presença de reação inflamatória. Tais aspectos foram quantificados

subjetivamente em leves (+), moderados (++) e intensos (+++) pelo autor do trabalho juntamente com o Dr. Edmar Zanoteli.

4.2.4 Reações imunoistoquímicas (IH)

Reação de imunoistoquímica utilizando anticorpos para distrofina, disferlina, sarcoglicanas, colágeno-6, emerina, merosina e caveolina-3 é realizada rotineiramente no nosso serviço para o diagnóstico de distrofias musculares, e foi feita em todos os casos incluídos neste estudo. A lista de anticorpos comerciais utilizados nestas reações está apresentada na Tabela 2.

Para a técnica de imunoistoquímica com peroxidase, os fragmentos musculares, não fixados, foram incubados com solução de bloqueio (0.1% BSA, 10% soro normal, 0.5% Tween em PBS) por 30' em temperatura ambiente. Após lavagem, os fragmentos foram então incubados com anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio por 1-3hs em temperatura ambiente. Após lavagem em tampão de lavagem (0.1% BSA, 0.5% Tween em PBS) os fragmentos foram incubados com anticorpo secundário por 30 min. em temperatura ambiente. As lâminas foram então mantidas em 0.1% de H₂O₂ por 30 min. para remover peroxidase endógena e então lavadas em tampão de lavagem. Procedeu-se assim com o método ABC, e após lavagem das lâminas aplicou-se DAB por 2 a 5 min. A reação é bloqueada com lavagem em água. Procedeu-se então à contra-coloração dos *slides* com hematoxilina, desidratação em álcool ascendente, lavagem em xileno, e montagem dos *slides*. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico. Como controle

interno, fragmentos musculares foram incubados apenas com anticorpo secundário.

Alternativamente, para alguns anticorpos foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta, na qual os fragmentos musculares, não fixados, são mantidos por 10 min. em ar ambiente e em seguida são bloqueados com tampão de bloqueio (2% BSA em PBS, soro normal e 0.2% triton-X 100) por 30 min. em temperatura ambiente. Então, os fragmentos foram incubados com anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio por 1-3hs em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS por três vezes, 10 min. cada, e bloqueados novamente com tampão de bloqueio por 20 min. Em seguida, os fragmentos foram incubados com anticorpo secundário por 1 (uma) hora em temperatura ambiente, e posteriormente lavados com PBS (4 vezes, 10 min. cada), e montados com Vectashild (Vector Laboratories, Burlingame, CA). As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência (Olympus DP72). Como controle interno, cortes foram incubados apenas com anticorpo secundário. A análise das reações seguiu a seguinte classificação: expressão normal da proteína, e redução parcial ou ausência da expressão.

Tabela 2: Anticorpos utilizados no estudo

Anticorpo	Clone	Empresa / Código	Título
Distrofina (domínios C, N e central)	Dy4/6D3, Dy8/6C5, Dy10/12B2	Novocastra	1:20
Disferlina	Ham1/7B6	Novocastra	1:20
Caveolina-3		Abcon	1:200
Adalina	Ad1/20A6	Novo castra	1:20
Gama- sarcoglicana	35DAG/21B5	Novo castra	1:20
Delta- sarcoglicana	deltaSarc3/12C1	Novo castra	1:20
Beta- sarcoglicana	betaSarc1/5B1	Novo castra	1:20
Merosina (lamina alfa-2, 300kDa)	Mer3/22B2	Novo castra	1:100
Emerina	4G5	Novo castra	1:400
Colágeno VI	5C6	Hybridoma bank	1:400

4.2.5 Coleta de sangue periférico para estudo molecular

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi coletada uma amostra de 5 a 10 ml de sangue periférico dos pacientes e dos familiares no Laboratório Central do HCFMUSP. Este material foi enviado para

o LIM45 (Disciplina de Neurologia Experimental-FMUSP), onde foi realizada a extração de DNA linfocitário usando protocolo descrito por Miller et al. ⁽⁸⁶⁾.

4.2.6 Estudo genético das sarcoglicanas

Neste estudo, a pesquisa de mutações foi realizada naqueles exons onde mais comumente são encontradas mutações na tentativa de identificar a sarcoglicana primariamente afetada. Foram estudados os exons 3 da α -sarcoglicana, 3 e 4 da β -sarcoglicana, 6 da γ -sarcoglicana e exon 8 da δ -sarcoglycana ⁽⁸⁷⁾.

Os pares de oligonucleotídeos usados para amplificar estes exons estão especificados na Tabela 3. Para as reações de PCR foram utilizados programas com um ciclo inicial de desnaturação (95°C por 4 minutos), seguido por 35 ciclos a 95°C por 30 seg., temperatura de anelamento específica para cada *primer* por 30 seg., e 72°C por 2 min., com um passo final de extensão a 72°C por 7 minutos. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) contendo brometo de etídio para visualização em luz de ultravioleta (UV). Os fragmentos de DNA foram purificados usando a enzima Exosap (Applied Biosystems).

Tabela 3: Sequência de *primers* para seqüenciamento nos genes das sarcoglicanas

Nome	oligonucleotídeos (5' –3')	exon	Produto PCR
SGCA	GGGCTCCTGCTGACTCGA ATGGCCACCCCTGTGATTTT	3	239
SGCB	TGGTGATAATATTTTCTACTTGTTC GCCCCTCTCCTGTTGCATTTCTTC	3	312
SGCB	ATTGTTTCAGGAATTTTGTTCAGTCT ATTCTCTCCCATAGTAAACAAAGCC	4	350
SGCG	GGTGTCACCTATTTTACTTCTGC CTAACATTATTCCAGCACATACC	6	198
SGCD	CCTTGAGCATGAACTTCCTTTTGTA TGGCCTGTTGAAGCTGTAGCTCT	8	270

4.2.7 Estudo genético do gene FKRP

Todos os pacientes, nos quais os procedimentos histológicos não permitiram definir a forma específica de distrofia de cinturas, foram submetidos à pesquisa de mutações no gene *FKRP*.

O gene *FKRP* possui quatro exons; no entanto, apenas o exon 4 é codificador. Os pares de oligonucleotídeos usados para amplificar todo o exon 4 estão especificados na Tabela 4. Para as reações de PCR foram utilizados programas com um ciclo inicial de desnaturação (95°C por 4 minutos), seguido por 35 ciclos a 95°C por 30 seg., temperatura de anelamento específica para

cada *primer* por 30 seg., e 72°C por 2 min., com um passo final de extensão a 72°C por 7 minutos. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) contendo brometo de etídio para visualização em luz de ultravioleta (UV). Os fragmentos de DNA foram purificados usando a enzima Exosap (Applied Biosystems).

Tabela 4: Sequência de primers e condições de *screening* usadas na região codificadora do FKRP

Nome	Oligonucleotídeos (5' –3')	Gene FKRP fragm	Produto PCR	Ann temp.	PCR obs.	Met
FKRP-1F FKRP-1R	TGGTTCTGACAATCAGCTGCT CCGCGTTGTCAAATGCCTCGAA	1	274	62	-	dHPLC temp.: 65C
FKRP-2F FKRP-2R	CCCGTGTCAACGTCCTGGTGC CCCGTGTCAACGTCCTGGTGC	2	332	65	1% DMSO	dHPLC temp.: 66C
FKRP-3F FKRP-3R	GCGTCCCTCGCGCTCAGCCTTCCA GCGTCCCTCGCGCTCAGCCTTCCA	3	369	66	5% DMSO	MDE gel
FKRP-4F FKRP-4R	GCAGCTGCTGGACTTGACCTTCGC CCCAGCAGTGAGCCGCCCTCGAG	4	348	61	5% DMSO	MDE gel
FKRP-5F FKRP-5R	TGGAGGCTGCGGGCGTGCGCTACT G CCACAGGTCCACGTGCAAGTGGT	5	257	67	-	dHPLC temp.: 65C
FKRP-6F FKRP-6R	TTCCGCGTGCAGTACAGCGAAAGC CCCGAAAAACAAAGGCGAGGTT	6	313	62	-	dHPLC temp.: 64C
FKRP-7F FKRP-7R	TTCCGCGTGCAGTACAGCGAAAGC AGAGCTTCTCCACATCCAGACA	7	339	62	-	dHPLC temp.: 64C

Legenda: Fragm, fragmento; ann temp., temperatura de anelamento; temp., temperatura para dHPLC.

4.2.8 Estudo genético do gene *LMNA*

Aqueles pacientes em que o estudo molecular para pesquisa de mutações no gene *FKRP* não identificou mutação e que possuíam quadro clínico compatível com a forma de distrofia de cinturas autossômica dominante 1B (LGMD1B) foram também submetidos a estudo molecular para o gene *LMNA* para pesquisa de mutações. Os 12 exons do gene *LMNA* foram amplificados em termocicladora marca Eppendorf, utilizando-se pares de oligonucleotídeos e protocolo previamente descrito. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados no estudo estão descritas na Tabela 5. Em geral, um volume final de 25 µl com cerca de 100 ng de DNA, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 200 µM dNTP, 1.5 a 2.0 mM MgCl₂, 10 pmol de cada *primer* e 1 U *Taq* polimerase, foi submetido a protocolo de PCR ajustado para cada par de oligonucleotídeo usado. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose de 1.5 a 2%, corado com brometo de etídio, e visualizados com luz ultravioleta. Os produtos amplificados foram então purificados utilizando-se kit para purificação de PCR (*GFXTM PCR DNA and gel band purification kit*, GE healthcare), de acordo com as recomendações do fornecedor.

Tabela 5: Sequência de oligonucleotídeos utilizados no estudo do gene *LMNA*

Exon	Forward primer /reverse primer	Nome
1	CCCAGATCCCGAGGTCCGAC / CCTCTCCACTCCCCGCCA	1f/r
2	CAGACTCCTTCTCTTAAATCTAC / CCTAGGTAGAAGAGTGAGTGTAC	2f/r
3	CCTTCAAGTTCTTGTGTTCTGTGAC / CCTAGCCCAGCCCAAGTCTGTC	3f/r
4	GGCCTCCCAGGAATAATTCTG / CTCCCTGCCACCATCTGC	4f/r
5	GCTGTAGCAGTGATGCCCAAC / CCAAAGCCCTGAGAAGTGAAG	5f/r
6	GCCAGGACTATGTTTAGAGCTTG / GGTCTAGTCAAGGCCAGTTG	6f/r
7	CCCCACTTGGTCTCCCTCTCC / CCCTGATGCAGCTGTATCCCC	7f/r
8	GAGGCCTCAATTGCAGGCAGGC / GAAAAGGACACTTACCCAGC	8f/r
9	GGAGCGCTGGGGTAAGTGTC / CTCGTCCAGCAAGCAGCCAG	9f/r
10	GTAAGCAGCAGGCCGGACAAAG / CACAGGAATATTCCATGGCATC	10f/r
11	GGAGCCTGCAGGAGCCTGGAGC / GCTGCGGAAGAGAAGGCAGGCTC	11f/r
12	CTTGTCTGAGCCCCAGACTGGAG /	12f
	GGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATC / AGGGAAAAGGAAGGGAGGAGAAAT	12F04/R04

4.2.9 Estudo genético do gene *CAPN3*

Em virtude das dificuldades encontradas na técnica de WB para estudo das calpainopatias e com intuito de identificação desta forma de distrofia de cinturas, foi realizada a pesquisa de mutações nos exons 1, 2, 4, 5, 11 e 22 do gene *CAPN3* em que são encontradas mais de 80% das mutações já descritas

responsáveis pela forma LGMD2A ⁽⁴⁵⁾. Os exons com regiões intrônicas adjacentes do gene *CAPN3* foram amplificados por PCR usando pares de oligonucleotídeos específicos (Tabela 5) e nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, seguida de temperatura de anelamento específica por 45 segundos e 72°C por um minuto, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) com brometo de etídio para serem visualizados em luz ultravioleta (UV) e, posteriormente, foram purificados com a enzima Exosap (Applied Biosystems).

Tabela 6: Sequência de *primers* a serem usados para a análise do gene *CAPN3*.

Exon	Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)
1 Fow	TTTGCAGTTGCTTCCTTTC	488
1 Rev	GCAGGTGCTGAGTGAGAG	
2 Fow	GCCAAGATTGCACCAAGTG	279
2 Rev	GTCCCTTTACCTCCTGGAAG	
4 Fow	CTGAGGAATGTGGAGGAAGG	299
4 Rev	GCCTCTTCCTGTGAGTGAGG	
5 Fow	ACATCACAGCATCCAAGAGG	353
5 Rev	AAAGCTCTATGCTGCCCTTC	
11 Fow	TAAATGGCTCCCTCTGTCTC	323
11 Rev	CTCTAGAAGCCCCTGGAAG	
22 Fow	ACTTTCCTTCCCAGGTC	284
22 Rev	AGATGCCTGTTGCCACAA	

4.2.10 Sequenciamento

O sequenciamento dos genes das sarcoglicanas, *FKRP*, *LMNA*, *CAPN3* foi realizado nas duas direções usando os mesmos pares de oligonucleotídeos usados nas reações de PCR, no aparelho 3730 DNA Analyzer da Applied Biosystems (Foster City, CA), no Laboratório de Endocrinologia da FMUSP (LIM25), ou no sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare), localizado no laboratório de Alergia e Imunologia Experimental (LIM 56). As sequências obtidas foram analisadas nos programas *Chromas 213* e *Mutation Surveyor Demo V 3.20*.

As mutações encontradas nestes genes foram comparadas com os bancos de dados disponíveis online nos endereços www.umd.be (*Universal Mutation Database*) e <http://www.hgmd.org> (HGMD - *Human Gene Mutation Database*).

5. RESULTADOS

Fizeram parte deste estudo 39 pacientes, sendo 30 (77%) do sexo feminino e nove (23%) do sexo masculino, originados de 36 famílias diferentes. Vinte e oito pacientes (71,8%) são naturais e provenientes do Estado de São Paulo e 11 (28,2%), de outros estados (quatro do Piauí, um da Bahia, um de Pernambuco, um da Paraíba, um de Sergipe, um de Santa Catarina, um de Minas Gerais e um do Paraná). A idade de início da doença variou de dois a 13 anos, com mediana de 6 anos. A idade de início foi definida como a idade em que os pais notaram as primeiras dificuldades motoras da criança. Nenhum deles teve atraso motor significativo. Trinta e quatro (87%) dos 39 pacientes iniciaram os sintomas na primeira década de vida. Os sinais e sintomas na apresentação clínica incluíram: quedas frequentes (22 pacientes), dificuldade em subir escadas (12 pacientes), marcha digitígrada (três pacientes) e dificuldade para se levantar do chão (dois pacientes). Os níveis de CK foram elevados em todos os pacientes.

Dentre os 39 pacientes, 37 foram diagnosticados com uma das formas de distrofia de cinturas. Em dois pacientes, foi detectada deficiência total da marcação da emerina na membrana nuclear pela técnica de imunofluorescência, confirmando o diagnóstico de distrofia de Emery-Dreifuss que não faz parte do grupo das distrofias de cinturas; eles haviam sido incluídos no grupo total de pacientes por ter modo de apresentação superponível à síndrome de cinturas em crianças, porém foram excluídos da classificação geral para cálculo das frequências. Dos 37 pacientes, 15 (40,5%)

foram diagnosticados com sarcoglicanopatias (LGMD2C-F); cinco (13,5%) com calpainopatia; cinco (13,5%) com disferlinopatia (LGMD2B); dois (5,5%) com laminopatia (LGMD1B); dois (5,5%) com alfa-distroglicanopatia (LGMD2I), e um paciente (2,5%) com caveolinopatia (LGMD1A). Em sete pacientes (19%) não foi possível definir o subtipo específico, apesar das técnicas utilizadas (Gráfico 1 e Tabela 7).

Gráfico 1. Frequência da distribuição das diversas formas LGMD nas crianças do estudo

Tabela 7: Características clínicas, laboratoriais e diagnósticos nos 39 pacientes do estudo

Casos	Sexo / idade	CK (X normal)	Sintoma inicial	Idade de início (anos)	Perda da marcha (anos)	Diagnóstico
1 A.C.S	F/15	40x	Quedas frequentes	4	10	Sarcoglicanopatia
2 C.S.S	F/11	10x	Difícil levantar chão	5	Não	Sarcoglicanopatia
3 A.P.P	F/19	35x	Difícil subir escadas	8	14	Sarcoglicanopatia
4 A.M.F	F/10	20x	Quedas frequentes	6	Não	Sarcoglicanopatia
5 D.M.J	F/18	10x	Quedas frequentes	5	Não	Sarcoglicanopatia
6 F.A.M	F/14	45x	Quedas frequentes	6	Não	Sarcoglicanopatia
7 T.S.P	F/11	20x	Difícil subir escadas	10	Não	Sarcoglicanopatia
8 T.T.S	F/13	8x	Quedas frequentes	6	Não	Sarcoglicanopatia
9 T.T.B	F/13	25x	Quedas frequentes	4	8	Sarcoglicanopatia
10 V.B.C	M/18	15x	Difícil subir escadas	4	Não	Sarcoglicanopatia
11 W.B.S	M/21	35x	Difícil subir escadas	8	14	Sarcoglicanopatia
12 O.S.S	M/11	60x	Quedas frequentes	6	11	Sarcoglicanopatia
13 E.F.S	F/13	60x	Difícil subir escadas	9	Não	Sarcoglicanopatia
14 T.A.S	F/12	40x	Quedas frequentes	4	Não	Sarcoglicanopatia
15 F.L.F	F/13	50x	Difícil subir escadas	7	12	Sarcoglicanopatia
16 R.M.F	F/12	8,5x	Quedas frequentes	3	Não	LGMD2B
17 Y.R.M	F/20	56x	Quedas frequentes	13	Não	LGMD2B
18 C.G.C	F/21	57x	Difícil subir escadas	12	Não	LGMD2B
19 V.C.S	F/11	46x	Quedas frequentes	8	Não	LGMD2B
20 L.S.S	F/15	25x	Quedas frequentes	5	Não	LGMD2B
21 A.A.L	M/19	14x	Marcha digitigrada	3	Não	EDMD
22 M.H.C	M/13	2x	Quedas frequentes	3	Não	EDMD
23 M.N.P	M/18	1,5x	Quedas frequentes	3	Não	LGMD1B
24 J.A.S	F/17	1,5x	Marcha digitigrada	2	Não	LGMD1B
25 L.B.W	F/8	30x	Difícil levantar do chão	2	7	LGMD2I
26 W.S.O	M/12	22x	Difícil subir escadas	8	9	LGMD2I
27 G.M.S	F/16	40x	Quedas frequentes	12	Não	LGMD2A
28 G.M.L	F/16	40x	Marcha digitigrada	12	Não	LGMD2A
29 D.B.S	F/16	10x	Difícil subir escadas	9	Não	LGMD2A
30 L.C.P	F/7	4x	Quedas frequentes	3	Não	LGMD2A
31 J.P.S	F/17	3x	Quedas frequentes	4	Não	LGMD2A
32 J.S.M	F/13	2x	Difícil subir escadas	10	Não	LGMD1C
33 B.S.N	F/16	60x	Quedas frequentes	8	12	LGMD ?
34 B.V.S	F/10	50x	Quedas frequentes	5	Não	LGMD ?
35 G.H.G	M/10	6,5x	Difícil subir escada	2	não	LGMD ?
36 H.B.M	F/10	8x	Quedas frequentes	6	Não	LGMD ?
37 L.R.C	F/17	5x	Difícil subir escadas	8	Não	LGMD ?
38 N.M.C	F/18	60x	Quedas frequentes	9	Não	LGMD ?
39 M.S.V	F/19	45x	Quedas frequentes	11	Não	LGMD ?

5.1 Sarcoglicanopatias

5.1.1 Aspectos clínicos

Quinze (três do sexo masculino e 12 do feminino) dos 37 pacientes classificados com distrofia de cinturas, foram diagnosticados como sarcoglicanopatia através do resultado encontrado na biopsia muscular e estudo imunoistoquímico. Apenas 13 destes pacientes foram submetidos à biopsia muscular, uma vez que, quando houve pares de irmãos, a biopsia foi realizada apenas em um.

Todos os pacientes deste subgrupo tiveram idade de início da doença na primeira década de vida, que variou de quatro a 10 anos com mediana de seis anos; seis (40%) manifestaram os primeiros sintomas até os cinco anos de idade. Consanguinidade entre os pais esteve presente em cinco (33,3%) sugerindo o padrão recessivo de herança, enquanto que em 10 pacientes (66,6%) o quadro apresentou-se como esporádico.

Os sinais e sintomas na apresentação clínica incluíram: quedas frequentes (oito pacientes), dificuldade em subir escadas (seis pacientes) e dificuldade para se levantar do chão (um paciente) (Tabela 6).

Tabela 8: Características clínicas dos 15 pacientes com sarcoglicanopatia

Casos	Sexo / idade	Consanguinidade / história familiar	Idade de Início (anos)	Sintoma inicial
1 A.C.S	F/15	Sim/Sim	4	Quedas frequentes
2 C.S.S	F/11	Sim/Sim	5	Dificuldade para levantar do chão
3 A.P.P	F/19	Não/Não	8	Dificuldade para subir escadas
4 A.M.F	F/10	Não/Não	6	Quedas frequentes
5 D.M.J	F/18	Não/Não	5	Quedas frequentes
6 F.A.M	F/14	Não/Não	6	Quedas frequentes
7 T.S.P	F/11	Não/Não	10	Dificuldade para subir escadas
8 T.T.S	F/13	Não/Não	6	Quedas frequentes
9 T.T.B	F/13	Não/Não	4	Quedas frequentes
10 V.B.C	M/18	Não/Não	4	Dificuldade para subir escadas
11 W.B.S	M/21	Não/Não	8	Dificuldade para subir escadas
12 O.S.S	M/11	Sim/Sim	6	Quedas frequentes
13 E.F.S	F/13	Sim/Sim	9	Dificuldade para subir escadas
14 T.A.S	F/12	Não/Não	4	Quedas frequentes
15 F.L.F	F/13	Sim/Não	7	Dificuldade para subir escadas

O padrão de fraqueza foi predominantemente proximal, sendo as extremidades inferiores mais precoce e gravemente afetadas do que as extremidades superiores em 11 pacientes. Não foi possível detectar pela história clínica, o tempo de latência entre a idade da manifestação da fraqueza nos membros inferiores e a idade na qual foi notada a fraqueza nos membros superiores. A musculatura de face estava preservada em todos os pacientes. Alguns sinais semiológicos foram frequentes nestes pacientes: escápula alada em oito (53,3%), hipertrofia de panturrilhas em seis (40%), e escoliose em quatro (26,6%). Seis pacientes (casos 1, 3, 9, 11, 12 e 15) perderam a marcha

no decorrer da evolução da doença, respectivamente aos 10, 14, 8, 21, 11 e 12 anos de idade. Os outros nove pacientes continuavam deambulando durante a última visita de seguimento, porém muitos apresentando dificuldades importantes, por exemplo, limitação para se levantar de uma cadeira ou do chão sem ajuda. Seis dos nove pacientes que ainda estavam deambulando receberam corticoterapia (deflazacort em cinco e prednisolona em um) quando começaram a apresentar piora da fraqueza muscular. Estes pacientes estão em seguimento, mantendo a marcha até o momento (Figura 2 e Tabela 7). Nenhum paciente apresentava evidência de déficit cognitivo.

Tabela 9: Achados clínicos em 15 pacientes com sarcoglicanopatia.

Casos	HP	Escoliose	ROT	Retração	Escápula alada	Envolvimento muscular	Perda da marcha (anos)
1	Não	Sim	-	+	Não	MMII>MMSS	10
2	Sim	Não	-	+	Não	MMII>MMSS	Não
3	Não	Não	-	+	Sim	MMII>MMSS	14
4	Não	Não	-	-	Não	MMII>MMSS	Não
5	Sim	Sim	-	-	Não	MMSS=MMII	Não
6	Não	Sim	-	+	Sim	MMII>MMSS	Não
7	Não	Não	-	-	Sim	MMII>MMSS	Não
8	Sim	Não	-	-	Sim	MMSS=MMII	Não
9	Não	Sim	-	+	Não	MMII>MMSS	8
10	Não	Não	↓	+	Sim	MMSS=MMII	Não
11	Não	Não	-	+	Não	MMII>MMSS	14
12	Não	Não	-	+	Sim	MMII>MMSS	11
13	Sim	Não	-	+	Sim	MMSS=MMII	Não
14	Sim	Não	-	+	Sim	MMII>MMSS	Não
15	Sim	Não	-	+	Não	MMII>MMSS	12

Legenda: HP, hipertrofia de panturrilhas; ROT, reflexos osteotendinosos; MMSS, membros superiores; MMII, membros inferiores; -, ausentes; ↓, hipoativos; +, presentes.

Figura 2: Pacientes com sarcoglicanopatias. Fraqueza dos membros superiores com limitação para elevação frontal (A), escápula alada (B) e hipertrofia de panturrilhas (C).

Todos os pacientes deste grupo tinham realizado ENMG que foi compatível com padrão miopático. Os níveis de CK, também obtidos em todos os pacientes, foram elevados (10 a 60 x acima do valor normal) nos estados iniciais da doença.

Avaliação cardiológica completa incluindo exame físico, eletrocardiograma, Rx de tórax e Ecocardiograma foi realizada em todos os pacientes. Em dois pacientes (casos 6 e 15) foi demonstrada uma cardiomiopatia com disfunção sistólica e fração de ejeção de 41 e 53%, respectivamente. Ambas as pacientes permanecem em seguimento cardiológico: a primeira (caso 6) no momento encontra-se em tratamento com furosemida (40 mg/dia), naprix (2,5 mg/dia) e metoprolol (50 mg/dia), e a segunda (caso 15), em uso de carvedilol (9,25 mg/dia).

O teste de função pulmonar realizado em todos os pacientes identificou: distúrbio restritivo leve em um paciente (caso 12) e distúrbio restritivo moderado em dois (casos 1 e 14). Estes pacientes estão em fisioterapia

respiratória utilizando suporte ventilatório domiciliar com ambu e máscara três vezes ao dia (Tabela 8).

Tabela 10: Exames complementares nos 15 pacientes com sarcoglicanopatia

Casos	CK	Eco (FE)	PFP	IH	Estudo molecular
1	40x	Normal	Restritivo moderado	α-SG	-
2	10x	Normal	Normal	nd	-
3	35x	Normal	Normal	n-SG	delta-SG
4	20x	Normal	Normal	n-SG	-
5	10x	Normal	Normal	n-SG	-
6	45x	41%	Normal	n-SG	-
7	20x	Normal	Normal	α-SG	-
8	8x	Normal	Normal	γ-SG	gama-SG
9	25x	Normal	Normal	n-SG	-
10	15x	Normal	Normal	α-SG	-
11	35x	Normal	Normal	α-SG	-
12	60x	Normal	Restritivo leve	n-SG	delta-SG
13	60x	Normal	Normal	nd	delta-SG
14	40x	Normal	Restritivo moderado	n-SG	beta-SG
15	50x	53%	Normal	n-SG	-

Legenda: n-SG, deficiência de duas ou mais sarcoglicanopatias; α-SG, alfa-sarcoglicanopatia; γ-SG, gama-sarcoglicanopatia; CK, creatinoquinase; ECO, ecocardiograma; FE, fração de ejeção; PFP, prova de função pulmonar; IH, imunoistoquímica.

5.1.2 Aspectos histológicos

A biopsia muscular realizada em 13 dos 15 pacientes deste grupo mostrou aspecto distrófico de moderado a grave, caracterizado por importante variabilidade de calibre de fibras, aumento de moderado a intenso de tecido

conjuntivo perimisial e/ou endomisial, centralização nuclear e necrose com macrofagia e sinais de regeneração. Outros achados incluíram *splitting* (sete pacientes), fibras hipercontraídas (quatro pacientes) e em um paciente observou-se uma fibra vermelha rasgada (paciente 5). A imunoistoquímica mostrou marcação normal para merosina, disferlina e caveolina ao redor da membrana da fibra em todos os casos. Redução concomitante de distrofina foi vista em um paciente (caso 4). Em quatro pacientes (casos 1, 7, 10 e 11) observou-se ausência total de marcação somente da α -SG e redução parcial da marcação das outras. Em um dos 13 pacientes (caso 8) a γ -SG mostrou-se totalmente deficiente em todas as fibras com redução parcial das outras sarcoglicanas. Nos outros casos houve redução ou ausência de marcação em duas ou mais das quatro sarcoglicanas (oito casos) (Figura 3 e 4 e Tabela 9).

Tabela 11. Aspectos histológicos nas sarcoglicanopatias: alterações na biópsia

Casos	Variação de calibre	CN	Tecido conjuntivo	Necrose	Outros	Padrão distrófico	IH
1	+++	+	++	-	-	grave	α-SG
2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
3	++	+	++	+	<i>Splitting</i> , fibras hipercontraídas	moderado	n-SG
4	+++	+	+++	+	<i>Splitting</i>	grave	n-SG
5	++	+	++	++	1 <i>ragged red fiber</i>	moderado	n-SG
6	++	+	++	+++	<i>Splitting</i> , fibras hipercontraídas	grave	n-SG
7	++	+	++	+	-	moderado	α-SG
8	++	+	++	+	-	moderado	γ-SG
9	+++	+	+++	++	<i>Splitting</i>	grave	n-SG
10	++	+	++	++	<i>Splitting</i>	moderado	α-SG
11	+++	++	++	++	Fibras hipercontraídas	grave	α-SG
12	++	+	++	+	<i>Splitting</i>	moderado	n-SG
13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
14	+++	+	+++	+++	Fibras hipercontraídas	grave	n-SG
15	+++	+	+++	++	<i>Splitting</i>	grave	n-SG

Legenda: -, ausente; +, leve; ++, moderado; +++, intenso; nd, não disponível; CN, centralização nuclear; IH, imunoistoquímica.

Figura 3: Padrão histológico normal pelas técnicas de HE e GO (A e D) e padrão distrófico em pacientes com sarcoglicanopatias (B, C, E, F, G, H e I).

Figura 4. Imunoistoquímica em biopsia muscular de pacientes com sarcoglicanopatias mostrando imunomarcagem de α , β e γ -SG normal ao redor das fibras (A-C) e redução ou ausência de marcação (D, E, F, G, H e I).

5.1.3 Aspectos moleculares

A pesquisa de mutações nos exons três da α -SG, três e quatro da β -SG, seis da γ -SG e oito da δ -SG, mostrou, até o momento, mutações em cinco dos 15 pacientes. Em três pacientes (caso 3, 12 e 13) foi encontrada a mutação em *frameshift* na δ -SG (c.657delC). A análise do gene da γ -SG em uma paciente (caso 8) revelou uma mutação em homozigose Δ 525T que resulta em um *frameshift* no codon 175 e uma troca de aminoácido nesta posição, de fenilalanina para leucina. Isto leva a uma produção *missense* de 18 aminoácidos que origina um *stop* codon prematuro na posição 194. Consequentemente há produção de uma proteína truncada em que mais da metade do domínio extracelular é perdido. Em outra paciente (caso 14) foi encontrada mutação em homozigose no exon 3 da β -SG, levando a uma troca de aminoácido metionina-lisina na posição 100 (C.299T>A MET100LYS).

Figura 5. Mutações nas sarcoglicopatias: mutação na β -SG c.299 T>A (met100lys) em A; mutação na γ -SG Phe(175)Leu to X(194) em B, e mutação na δ -SG (c.657delC) em C.

5.2 Disferlinopatias (LGMD2B)

5.2.1 Aspectos clínicos e histológicos

Cinco pacientes, todas do sexo feminino, foram diagnosticadas com distrofia de cinturas por deficiência da disferlina (LGMD2B), demonstrada através de imunomarcação anormal da proteína disferlina no músculo.

A idade de início da doença variou de três a 13 anos, com mediana de 8 anos. Nenhum dos casos apresentava consaguinidade ou história familiar. Os sintomas iniciais foram quedas frequentes (quatro casos) ou dificuldade para subir escadas (um caso). Em todos os pacientes a fraqueza iniciou-se na região proximal dos membros inferiores. Os níveis de CK foram acentuadamente elevados em todos os pacientes na fase inicial da doença (30-55 X o valor normal). Quanto ao trofismo, três pacientes (casos 16, 17 e 20) apresentavam evidente atrofia da musculatura do compartimento posterior das pernas e duas pacientes (casos 16 e 17) apresentavam também atrofia proximal de bíceps braquial. Todas apresentavam retrações incipientes nos tendões de Aquiles. Durante o seguimento nenhuma paciente perdeu a marcha e a evolução da doença apresentou-se lentamente progressiva. Avaliação cardíaca e prova de função pulmonar foram normais em todas as pacientes (Figura 6 e Tabela 10).

Histologicamente, a biopsia muscular mostrou padrão distrófico leve em todos os casos e em apenas uma paciente (caso 19) foi encontrada inflamação. A imunoistoquímica mostrou marcação parcial ou ausência de

marcação de disferlina pelas técnicas de imunoperoxidase ou imunofluorescência.

Figura 6: Paciente com disferlinopatia mostrando atrofia de musculatura de bíceps braquial (A), fraqueza dos membros superiores (B) e atrofia distal dos membros inferiores (C).

Tabela 12. Características clínicas dos pacientes com disferlinopatia

Casos	16 (R.M.S)	17 (Y.R.M)	18 (C.G.C)	19 (V.C.S)	20 (L.S.S)
Sexo/Idade	F/12	F/20	F/21	F/11	F/15
Idade de início	3	13	12	8	5
Primeiros sintomas	Quedas frequentes	Quedas frequentes	Dificuldade para subir escadas	Quedas frequentes	Quedas frequentes
Envolvimento muscular	MMII>MMSS	MMII>MMSS	MMII>MMSS	MMII>MMSS	MMII>MMSS
Perda da marcha	Não	Não	Não	Não	Não
Retrações	Aquileus	Aquileus	Aquileus	Aquileus	Aquileus
Outros achados	Atrofia distal MMII	Atrofia distal MMII	-	-	Atrofia global
CK (U/L)	1600	10831	10998	8820	4880
Ecocardiograma	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Prova de função pulmonar	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
BM (Padrão distrófico)	Leve	Leve	Leve	Leve com inflamação	Leve
Progressão	Lenta	Lenta	Lenta	Lenta	Lenta

Legenda: MMII, membros inferiores; MMSS, membros superiores; CK, creatinoquinase; BM, biópsia muscular.

Figura 7: Biopsia muscular de paciente com diferlinopatia mostrando padrão distrófico leve pela técnica HE (A) e ausência de marcação ao redor das fibras na imunoistoquímica (C), comparada ao padrão normal (B).

5.3 Distrofias de Cinturas por mutação no gene LMNA (LGMD1B)

5.3.1 Aspecto clínico e histológico

Dois dos 37 pacientes (5,5% do total) foram diagnosticados com distrofia de cinturas por mutação no gene *LMNA* (casos 23 e 24), caracterizando a forma LGMD1B.

Os sintomas iniciais dos pacientes deste grupo surgiram entre dois e três anos e os sinais apresentados foram quedas frequentes (caso 23) e marcha na ponta dos pés (caso 24). A progressão da fraqueza foi leve no caso 23 e moderada no caso 24, mas nenhum dos dois casos havia perdido a marcha até a última consulta de seguimento (Tabela 12).

No caso 23, a doença iniciou-se com quadro de quedas aos três anos de idade, associado a retrações de predomínio em tendões de Aquiles, tendo sido realizada tenotomia destes tendões bilateralmente aos nove anos de idade. A força muscular manteve-se estável até a idade atual, sendo graduada entre IV

a V nos quatro membros. A história familiar mostrava cinco parentes de origem paterna com histórico de cardiopatia (arritmias, morte súbita). A avaliação cardiológica com ECG, ECO e Holter não demonstraram anormalidades até o presente momento. De forma semelhante, a outra paciente (caso 24) manifestou o quadro precocemente aos dois anos de idade com marcha digitígrada e retrações de instalação precoce em tendões de Aquiles. Entretanto, a progressão da doença nesta paciente foi mais rápida. Avaliação cardiológica e prova de função pulmonar são normais. Não havia caso de cardiopatia ou fraqueza muscular na família. Em ambos pacientes os níveis de CK foram discretamente elevados (1,5 vezes o valor normal).

Tabela 13. Características clínicas e exames complementares dos pacientes com distrofia de cinturas por mutação no gene *LMNA*

Casos	23 (M.N.P)	24 (J.A.S)
Sexo/Idade	M/18	F/17
Idade de início (anos)	3	2
Primeiros sintomas	Quedas frequentes	Marcha digitígrada
Perda da marcha	Não	Não
Retrações	Aquilianas	Cotovelos, poplíteas e aquilianas
CK (U/L)	272	297
Ecocardiograma	normal	normal
Holter	normal	normal
Prova de função pulmonar	normal	normal
BM (Padrão distrófico)	leve	leve
IH (Emerina)	normal	normal
IH (Lamina A/C)	normal	normal
Estudo molecular	Exon 1 43C>CT	Exon 4 R249W

Legenda: BM, biópsia muscular; CK, creatinoquinase.

Figura 8. Paciente (caso 23) com distrofia muscular de cinturas com mutação no gene LMNA (A). Em B, padrão distrófico leve pela técnica HE; em C, ATPase 4,3 mostrando mosaico preservado; em D, marcação normal para emerina em técnica de IMF; em E, mutação em heterozigose no exon 1 do gene LMNA, e em F heredograma familiar.

5.3.2 Aspectos moleculares

O diagnóstico dessa forma de distrofia de cinturas foi realizado através do encontro de mutações no gene *LMNA*. Foram identificadas duas diferentes mutações. No caso 23 foi encontrada uma mutação nova em heterozigose no exon 1 e no caso 24 foi identificada uma mutação em heterozigose no exon 4, esta já descrita anteriormente (Tabela 13).

5.4. Distrofia de cinturas por mutação no gene FKRP (LGMD 2I)

5.4.1 Aspectos clínicos

Dois dos 37 pacientes (5,5% do total) foram classificados no subgrupo de distrofia de cinturas tipo 2I através da identificação de mutação no gene *FKRP*. Uma paciente (caso 25) apresentou quadro de fraqueza de predomínio nos membros inferiores, caracterizado por dificuldade para se levantar do chão desde a idade de dois anos e evolução rapidamente progressiva com perda da marcha aos sete anos de idade. Ao exame físico apresentava hipertrofia de panturrilhas e retrações aquilianas. O nível de CK mostrou-se bastante elevado (30X o valor normal). A avaliação cardiológica e respiratória foi normal. O outro paciente (caso 26) teve sua doença iniciada aos oito anos de idade com quadro de dificuldade para subir escadas. Não apresentava hipertrofia de panturrilhas, escoliose ou escápula alada. Havia retrações aquilianas, poplíteas e em cotovelos. A evolução foi rápida, com perda da marcha um ano após o início do quadro. O nível de CK também foi elevado (20X normal). A avaliação cardiológica e respiratória não mostrou alteração (Tabela 13 e Figura 9).

Tabela 14. Características clínicas nos pacientes com distrofia de cinturas tipo 2l

Casos	25 (L.B.W)	26 (W.S.O)
Sexo/Idade	F/8	M/12
Idade de início (anos)	2	8
Primeiros sintomas	Dificuldade para se levantar do chão	Dificuldade para subir escadas
Escápula alada	Não	Não
Hipertrofia de panturrilhas	Sim	Não
Escoliose	Não	Não
Macroglossia	Não	Não
Envolvimento Muscular	MMII>MMSS	MMII>MMSS
Perda da marcha	7 anos	9 anos
Retrações	Aquilianas	Aquilianas, poplíteas e em cotovelos
CK (U/L)	5671	4393
Ecocardiograma	Normal	Normal
Prova de função pulmonar	Normal	Normal
BM (Padrão distrófico)	Moderado	Moderado
Imunoistoquímica	Normal	Normal
Estudo molecular	826C>A em homozigose	c.585C>T em heterozigose
Progressão	Rápida	Rápida

Legenda: CK, creatinoquinase; BM, biópsia muscular; MMII, membros inferiores; MMSS, membros superiores.

Figura 9: Paciente com mutação no gene *FKRP* apresentando fraqueza nos membros superiores (A) e retrações em região poplíteia (B) e tendão de Aquiles (C).

5.4.2 Aspectos histológicos

As biopsias musculares dos dois pacientes com mutação no gene *FKRP* mostraram padrão distrófico moderado em ambos com imunomarcagem normal da distrofina, disferlina, caveolina e sarcoglicanas ao redor das fibras. Em ambos foi encontrada imunomarcagem parcial para merosina (Figura 10).

Figura 10: Aspectos histológicos na biópsia muscular de paciente com LGMD2I (caso 25). Padrão distrófico moderado (A-C) e imunoistoquímica mostrando deficiência parcial de marcação de merosina (D) com marcação normal para caveolina (E) e β -sarcoglicana (F).

5.4.2 Aspectos moleculares

O estudo molecular para pesquisa de mutações no exon 4 do gene *FKRP* mostrou uma mutação em homozigose (826C>A) no caso 25 e uma outra mutação missense em heterozigose com troca de nucleotídeo 585C>T no caso 26 (figura 11).

Figura 11: Mutações no gene FKRP. Em A, mutação em homozigose 826C>A (caso 26); em B mutação em heterozigose 585C>T (caso 27).

5.5 Calpainopatias (LGMD2A)

5.5.1 Aspectos clínicos

Cinco pacientes, todas do sexo feminino, foram diagnosticadas com calpainopatia, LGMD2A, através da identificação de mutações patogênicas no gene *CAPN3*. Estas pacientes tiveram idade de início da doença entre três e 12 anos, com mediana de nove anos, ocorrendo o início da fraqueza nos membros inferiores, manifestada através de quedas frequentes em três casos, dificuldade para subir escadas em um caso e marcha alterada em um caso.

A presença de retrações aquilianas foi encontrada em quatro das cinco pacientes e em três foi encontrada escápula alada. Os níveis de CK foram altos em todos os casos, sendo que em duas irmãs gêmeas (casos 27 e 28) os níveis alcançaram 40 vezes o valor normal. A doença mostrou um padrão de progressão lenta em todas as pacientes com exceção do caso 27 que após

cinco anos de evolução do quadro já demonstra sinais de perda iminente da marcha. As provas de função pulmonar e avaliação cardiológica foram normais em todos os pacientes durante todo o seguimento (Tabela 13) (Figura 12).

Figura 12: Irmãs gêmeas com calpainopatia, caso 27 e 28, mostrando variabilidade intrafamiliar. Em A (caso 27), fraqueza proximal dos membros superiores; em B (caso 28), força preservada; em C, escápula alada; em D, simetria de atrofia. Em E, biópsia muscular mostrando padrão distrófico moderado e em F, imunoistoquímica normal para disferlina. Mutação patogênica no gene CAPN3 (G).

Tabela 15. Características clínicas nos pacientes com distrofia de cinturas tipo 2A

Casos	G.M.L.(27)	G.M.L.(28)	D.B.S.(29)	LCP(30)	J.P.S.(31)
Sexo/Idade	F/16	F/16	F/16	F/7	F/17
Idade de início	12	12	9	3	4
Primeiros sintomas	Quedas frequentes	Marcha digitígrada	Dificuldades subir escadas	Quedas frequentes	Quedas frequentes
Perda da marcha	Não	Não	Não	Não	Não
Retrações	Aquilianas	Aquilianas	Aquilianas	Aquilianas	-
Outros achados	Escápula alada, HP	Escápula alada	Escápula alada	Escápula alada, escoliose	-
CK (x normal)	40	40	10	4	3
Eco	normal	normal	normal	normal	normal
Prova de função pulmonar	normal	normal	normal	normal	normal
BM (Padrão distrófico)	moderado	nd	moderado	moderado	moderado
Progressão	moderada	lenta	lenta	lenta	lenta
Estudo molecular	c.96T>C no exon 1 e R110X no exon 2	c.96T>C no exon 1 e R110X no exon 2	c.2050+1G>A e c.2288A>G (p.Tyr763Cys)	c.706G>A no exon 5 (Ala236Thr)	c.78G>A no exon 1

Legenda: CK, creatinoquinase; Eco, ecocardiograma; BM, biópsia muscular; HP, hipertrofia de panturrilhas; nd, não disponível.

5.5.2 Aspectos histológicos

Quatro das cinco pacientes foram submetidas à biópsia muscular que mostrou padrão distrófico moderado em todos os casos. *Splitting* e fibras lobuladas ocorreram em dois pacientes (casos 27 e 29) e em um paciente (caso 30) foram encontradas grandes áreas de falhas focais tipo *minicore* na técnica NADH (Figura 13).

Não foi encontrada inflamação em nenhuma das biópsias dos pacientes deste grupo. O estudo imunoistoquímico mostrou marcação normal para distrofina, disferlina, sarcoglicanas, merosina e caveolina (Figura 12).

Figura 13. Aspectos histológicos de biópsias de pacientes com calpainopatia: padrão distrófico moderado no HE e GO (A, B, D, E); presença de fibras lobuladas (C), e falhas focais tipo *minicore* em grande quantidade (F) pela técnica NADH.

5.5.3 Aspectos moleculares

O estudo molecular encontrou diferentes mutações. Nos casos 27 e 28, irmãs gêmeas dizigóticas, foram encontradas duas diferentes mutações: c.328C>T no exon 2, mutação patogênica com troca de aminoácido R110X (já descrita anteriormente) e c.96T>C no exon 1 (já descrita como variante). No caso 29 foram encontradas duas mutações patogênicas: c.2050+1G>A e 2288A>G (p.Try763Cys) já descritas previamente. Nas duas outras pacientes (casos 30 e 31) foram encontradas mutações em heterozigose: c.706G>A no

exon 5 (já descrita em pacientes com calpainopatia) no caso 30 e c.78G>A no exon 1 (esta ainda de desconhecida patogenicidade) no caso 31.

5.6 Caveolinopatia (LGMD1C)

5.6.1 Aspectos clínicos e histológicos

Uma paciente (caso 29) apresentou um quadro com início no final da infância caracterizado por fraqueza de predomínio nos membros inferiores associado a retrações incipientes nos tendões de Aquiles. O nível de CK encontrou-se levemente elevado e a biopsia muscular mostrou um padrão distrófico leve com redução parcial de marcação da caveolina no músculo e marcação normal das outras proteínas. A avaliação cardiológica e respiratória foi normal e a paciente evolui de forma estável (Tabela 14).

Tabela 16. Aspectos clínicos e histológicos em paciente com caveolinopatia

Caso	Sexo/ Idade	Idade de início (anos)	Sintoma inicial	Perda da marcha (anos)	CK	Achados clínicos	Padrão distrófico
32 J.S.M	F/13	10	Dificuldade para subir escadas	Não	2X	Retrações aquilianas	Leve

Legenda: CK: creatinoquinase

5.7 Fenótipos das distrofias de cinturas sem subtipo definido

Em todos os pacientes deste grupo a biópsia muscular mostrou padrão distrófico e a imunoistoquímica mostrou marcação normal para as proteínas distrofina, disferlina, emerina, caveolina e sarcoglicanas. Os pacientes foram triados para procura de mutação de ponto do gene *FKRP* que resultou negativa. A procura de mutações nos exons estudados no gene *CAPN3* também não foi elucidativa. Alguns pacientes, fenotipicamente, se assemelham a determinadas formas de distrofia de cinturas, mas ainda não houve confirmação imunoistoquímica ou através de estudo molecular. Um paciente (caso 35) apresenta fenótipo muito semelhante à distrofia de Emery-Dreifuss com retrações em pescoço, cotovelos e aquilanas. O estudo de imunoistoquímica mostrou marcação normal das proteínas emerina e lamina A/C ao redor da membrana nuclear e este paciente aguarda a complementação do estudo de pesquisa de mutações no gene *LMNA*. Todos os pacientes deste grupo apresentam uma evolução lentamente progressiva da doença com exceção de uma paciente (caso 33) que evoluiu com perda da marcha quatro anos após o início dos sintomas, ocorrido aos 12 anos de idade. Finalmente, uma paciente (caso 38) apresenta na biópsia muscular, além do padrão distrófico, agregados intracitoplasmáticos que lembram miopatia miofibrilar.

Todos os pacientes apresentam até o momento avaliação cardiológica normal. A prova de função pulmonar foi realizada ao menos uma vez em cada paciente após o início do seguimento e apenas uma paciente (caso 36) apresentou um distúrbio respiratório restritivo com redução de CVF. Esta

paciente encontra-se em reabilitação respiratória com ambu e máscara três vezes ao dia (Tabela 15).

Tabela 17. Características clínicas e histológicas em pacientes com LGMD sem subtipo definido.

Casos	Sexo/ Idade	Idade de início (anos)	Sintoma inicial	Perda da marcha (anos)	CK (X normal)	Achados clínicos	Padrão distrófico
33 B.S.N	F/16	8	Quedas frequentes	12	60x	Retrações múltiplas	Grave
34 B.V.S	F/10	5	Quedas frequentes	Não	50x	EA,ES, RA	Moderado
35 G.H.G	M/10	2	Dificuldade em subir escada	Não	6,5x	Retrações múltiplas	Grave
36 H.B.M	F/10	6	Quedas frequentes	Não	8x	RA	Leve
37 L.R.C	F/17	8	Dificuldade em subir escadas	Não	5x	EA,HP RA	Leve
38 N.M.C	F/18	9	Quedas frequentes	Não	60x	EA	Leve, com agregado
39 M.S.V	F/19	11	Quedas frequentes	Não	45x	HP,RC	Moderado

Legenda: CK, creatinoquinase; EA, escápula alada; HP, hipertrofia de panturrilhas; ES, escoliose; RA, retrações aquilianas; RC, retrações de cotovelos.

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo brasileiro, clínico e de frequência, sobre a distrofia muscular de cinturas em uma população exclusivamente pediátrica atendida em um centro especializado em doenças neuromusculares.

Desde a proposta de uma nova nomenclatura e classificação das distrofias de cinturas em 1995 ⁽⁸⁸⁾, algumas alterações na frequência das diferentes formas já aconteceram, particularmente a partir de 2001 quando foi evidenciado que mutações nas enzimas responsáveis pela glicosilação da alfa-distroglicana também podiam ser responsáveis por formas da doença ^(34, 58, 59). Até esta época as formas de cinturas LGMD2A e LGMD2B causadas por mutações no gene *CAPN3* e *DYSF*, respectivamente, eram as mais encontradas ao redor do mundo e também no Brasil ^(24, 34). A partir de 2001, com a identificação de mutações no gene *FKRP*, inicialmente associadas a uma forma de DMC ⁽⁵⁸⁾, e logo depois a um quadro de distrofia de cinturas ⁽⁸⁹⁾, a prevalência mudou, encontrando-se grande frequência de distrofias de cinturas, causadas por mutação neste gene, caracterizando a LGMD2I, particularmente nos países do leste Europeu, onde passou a rivalizar com as formas anteriormente conhecidas ⁽⁹⁰⁻⁹²⁾. Depois da LGMD2I, novas formas de distrofia de cinturas causadas por mutações em outras proteínas responsáveis pela glicosilação da alfa-distroglicana foram sendo identificadas, porém em menor frequência do que a causada pela mutação no gene *FKRP*. Em 2010, com a identificação de mutações no gene da anoctamina-5, ocorreu uma nova mudança na frequência e prevalência destas doenças, passando a se

diagnosticar grande número de casos de pacientes com distrofia de cinturas por mutação neste gene, forma LGMD2L, exclusivamente em adultos, e principalmente em países do norte da Europa ^(65, 67).

Não existem muitos estudos sobre a prevalência das diferentes formas de distrofia de cinturas em crianças. Os estudos de frequência geralmente englobam as formas de início na infância e em adultos. Em estudo americano recente sobre as distrofias de cinturas de início na infância foram relatadas as seguintes frequências entre as diferentes formas de LGMD: 16% de LGMD2A; 8% de LGMD2B; 26% de LGMD2C a F; 4% de LGMD2I; 3% de LGMD2L; 1% de LGMD1A; 4% de LGMD1B, e 37% sem identificação de subtipo específico⁽⁹³⁾. No Brasil, os estudos populacionais de frequência são escassos^(24, 34, 94).

Fizeram parte do nosso estudo 39 crianças provenientes de diversas regiões do Brasil, sendo a maioria do Estado de São Paulo, não tendo sido possível avaliar, epidemiologicamente, se existe predomínio de determinada forma por região, visto que grande parte das crianças provenientes de São Paulo é natural de outros Estados, tendo imigrado com familiares para o Estado de São Paulo. Além disso, há outros grandes centros de estudo de doenças neuromusculares na região sudeste do Brasil, o que invalida aventar cifras de prevalência.

Ambos os sexos foram acometidos, porém com proporção de 3:1 a favor do sexo feminino, o que não é observado em outros estudos e no nosso deve ter sido um achado fortuito já que o padrão de herança de forma autossômica dominante ou recessiva não privilegia um dos sexos ⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾. Há autores que consideram que em algumas casuísticas poderia haver inclusão errônea de

meninos com distrofinopatia tipo Becker que também mostram padrão sindrômico de cinturas e padrão distrófico na biópsia muscular e cuja redução parcial de marcação da distrofina no músculo poderia ser julgada como decorrente de um defeito primário em outra proteína do complexo distrofina-glicoproteína que não a distrofina ^(10, 31). Acreditamos que tal confusão diagnóstica só pode ocorrer quando não existe acesso ao diagnóstico molecular ou naqueles casos de distrofia de Becker em que não se detecta a mutação pelos testes moleculares de rotina. Por outro lado, é possível que pacientes com fenótipo e evolução semelhante à distrofia de Duchenne/Becker que não foram encaminhados a um serviço especializado, sejam mal diagnosticados, por exemplo, no caso de sarcoglicanopatias, e acompanhados erroneamente como casos de distrofinopatia, que é a forma mais frequente de distrofia em meninos ⁽⁹⁷⁾.

Na maioria dos nossos pacientes não havia história familiar positiva. Já foi demonstrado que em populações caucasianas as formas autossômicas dominantes são responsáveis por aproximadamente 14% dos casos, as formas recessivas por 34% e na maioria (52% dos casos) não há história familiar ⁽¹⁸⁾. No nosso estudo, em oito casos (20% do total) havia história de consanguinidade sugerindo um padrão recessivo de herança, mas a maioria dos casos foram considerados esporádicos.

As sarcoglicanopatias (LGMD2C-F) constituíram 40,5% dos casos de distrofia de cinturas no presente estudo, sendo a forma mais comumente encontrada. Moore et al., em um estudo clínico e histopatológico nos Estados Unidos, encontraram uma frequência de 15% de sarcoglicanopatias, sendo a segunda forma mais frequente após a disferlinopatia ⁽⁹⁸⁾. Em outros estudos,

inclusive no Brasil, foi demonstrado que a sarcoglicanopatia é a forma mais comum, particularmente quando analisamos as formas mais graves da doença e de início mais precoce^(93, 99, 100).

Todos os pacientes do subgrupo das sarcoglicanopatias tiveram início da doença na primeira década de vida com idades que variaram de quatro a 10 anos (mediana de seis anos). Os seis pacientes que perderam a marcha iniciaram a sintomatologia entre quatro e oito anos e o tempo de evolução até a perda da marcha variou de quatro a seis anos. Estes pacientes apresentaram alto nível de CK (25-60X o normal) e padrão distrófico moderado (casos 3 e 12) ou grave (casos 1, 9, 11 e 15), dados que parecem sugerir evolução mais rápida em associação à idade de início mais precoce. Há trabalhos que sugerem que os níveis de CK são mais elevados na α -sarcoglicana⁽²⁴⁾, porém isso não pode ser comprovado em nosso estudo.

Alguns estudos têm demonstrado que a α -sarcoglicana é a subunidade do complexo das sarcoglicanas mais frequentemente reduzida em uma sarcoglicanopatia primária^(31, 100). Já outros trabalhos mostram maior variabilidade no padrão de expressão, desde total ausência de todo o complexo de sarcoglicanas até a preservação somente da γ -sarcoglicana com redução parcial similar das α - e β -sarcoglicana⁽⁹⁹⁾. No presente estudo a deficiência de duas ou mais das quatro sarcoglicanas foi o padrão mais encontrado (oito dos 13 pacientes que fizeram a biópsia muscular ou 61,5%). A ausência total de α -sarcoglicana com redução parcial das outras foi vista em quatro pacientes; em um paciente houve ausência total de γ -sarcoglicana com redução parcial das outras, não sendo possível identificar através do estudo imunoistoquímico qual a sarcoglicana primariamente afetada. Alguns trabalhos consideram que se um

paciente apresenta estudo imunoistoquímico mostrando deficiência de todas as quatro sarcoglicanas, poderia ser diagnosticado com α -sarcoglicanopatia^(101, 102). Entretanto, já foi encontrada uma mutação patogênica no gene SGCG confirmando um caso de γ -sarcoglicanopatia, com ausência de todas as sarcoglicanas no estudo imunoistoquímico⁽⁸⁷⁾. Por consequência, uma vez que na biopsia muscular com estudo imunoistoquímico pode ser difícil definir qual a sarcoglicana inicialmente afetada, a demonstração da mutação em um dos genes das sarcoglicanas é necessária para definir onde se encontra o defeito primário.

Foi realizada neste estudo a pesquisa de mutações em alguns exons onde mais comumente são encontradas as mutações nas diferentes sarcoglicanopatias. Foram estudados os exons 3 da α -sarcoglicana, 3 e 4 da β -sarcoglicana, exon 6 da γ -sarcoglicana e exon 8 da δ -sarcoglicana⁽⁸⁷⁾. Esta pesquisa de mutações nos quatro genes das sarcoglicanas foi positiva, até o momento, em cinco dos 15 pacientes. Embora relativamente rara, correspondendo a 13% dos casos de sarcoglicanopatias na nossa população, identificamos a mesma mutação no gene SGCD (δ -sarcoglicana) em três pacientes (caso 3, 12 e 13). A mutação em *frameshift* na c.657delC é a mais frequentemente encontrada neste gene na nossa população, tendo sido introduzida por ancestrais africanos, e parece estar relacionada a um espectro mais grave da doença⁽¹⁰³⁾. De fato, a paciente (caso 3) apresentou um quadro rapidamente progressivo com perda da marcha aos 14 anos de idade. Já os outros dois pacientes (caso 12 e 13), irmãos, mostraram uma evolução diferente. Enquanto um (caso 12) teve quadro de início mais precoce, aos seis anos, e curso rapidamente progressivo que levou à perda da marcha aos 11

anos de idade, sua irmã (caso 13) iniciou a doença aos nove anos de idade e tem progressão mais lenta. Em apenas um (caso 13) estava presente hipertrofia de panturrilhas, demonstrando que na delta-sarcoglicanopatia também existe variabilidade intrafamiliar. A biópsia muscular foi realizada apenas no paciente com quadro mais grave e mostrou padrão distrófico intenso; o estudo imunoistoquímico denotou ausência de marcação de todas as sarcoglicanas.

A análise do gene da γ -SG em uma paciente (caso 8) revelou uma mutação em homozigose $\Delta 525T$ que resulta em um *frameshift* no codon 175 e uma troca de aminoácido nesta posição, de fenilalanina para leucina. Isto leva a uma produção *missense* de 18 aminoácidos que origina um *stop* codon prematuro na posição 194. Consequentemente, há produção de uma proteína truncada em que mais da metade do domínio extracelular é perdido. A imunoistoquímica desta paciente mostrou marcação normal da α e β -SG com ausência total de marcação da γ -SG. Esta mutação já foi anteriormente descrita, associada a quadro de cardiomiopatia, comprometimento muscular leve e nível de CK pouco elevado (5-10 vezes o normal) ⁽¹⁰⁴⁾. A paciente do nosso estudo está sendo monitorada regularmente do ponto de vista cardiológico não tendo sido encontradas alterações até o momento. Em outra paciente (caso 14) foi encontrada mutação em homozigose no exon 3 do gene da β -SG, que levou a uma troca de aminoácido metionina-lisina na posição 100 (C.299T>A MET100LYS). Também esta mutação parece estar relacionada a um fenótipo mais grave na população brasileira ^(103, 105), semelhante ao encontrado em nossa paciente. Moreira et al., estudando as principais mutações em nossa população e sua correlação fenotípica, encontrou

mutações em 35 famílias sendo que a frequência de cada uma das formas de LGMD 2C a 2F foi de 23%, 40%, 23%, e 14%, respectivamente. Tal estudo sugere que as quatro sarcoglicanopatias são bem representadas no Brasil em contraste ao que se têm observado em outros países ⁽¹⁰³⁾. Enquanto que na Europa e América do Norte a grande maioria dos pacientes com sarcoglicanopatias apresenta o tipo 2D (alfa-sarcoglicanopatia), a forma LGMD2C (gama-sarcoglicanopatia) representa quase 100% das sarcoglicanopatias no norte da África. A forma LGMD 2F parece ser rara ao redor do mundo ^(9, 34, 103).

Em seis dos nove pacientes que ainda estavam deambulando, porém apresentando piora rápida da fraqueza muscular que sinalizava a iminente perda da marcha, foi iniciada corticoterapia (deflazacort em cinco pacientes e prednisolona em um paciente) com o intuito de lentificar a progressão da doença. A rápida piora da fraqueza foi caracterizada por quedas mais frequentes, dificuldade maior para se levantar da cadeira ou do chão ou ainda maior dificuldade para subir escadas quando comparada à avaliação anterior.

A corticoterapia é tradicionalmente empregada para diminuir o ritmo de progressão da doença na distrofia de Duchenne/Becker (DMD/DMB). O tratamento mostra potencial em atrasar o desenvolvimento da insuficiência respiratória restritiva, da escoliose e da extensão do envolvimento cardíaco. Os mecanismos não estão completamente esclarecidos, mas a histopatologia muscular sugere que o corticóide pode induzir benefício potencial de inibir a proteólise muscular, estabilizar a fibra muscular, reduzir a concentração intracelular de cálcio e estimular a proliferação de mioblastos ⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾. Entretanto, o potencial benefício dos corticóides no tratamento de outros tipos

de distrofias é controverso. Como a progressão clínica e histopatológica das sarcoglicanopatias com fenótipo mais grave é similar à observada na DMD e em ambas as situações o mecanismo básico da doença está relacionado à desintegração do complexo de proteínas localizado no sarcolema da fibra muscular, optamos por tratar aqueles pacientes com progressão rápida, indicada pela perda iminente da marcha. Estes pacientes estão em seguimento há um ano (casos 7, 13 e 14), dois anos (casos 2 e 6) e quatro anos (caso 5). Após o início da corticoterapia, a avaliação da força muscular mostrou uma leve melhora em dois pacientes (casos 5 e 6), uma estabilização do quadro (caso 2) e leve piora em três pacientes (casos 7, 13 e 14), esta podendo ser atribuída à progressão natural da doença. Nenhum paciente havia perdido a marcha até a data da última avaliação. A avaliação cardiológica através de ecocardiograma mostrou leve melhora da fração de ejeção em dois pacientes (casos 5 e 7) e a avaliação da função respiratória pela espirometria mostrou melhora na capacidade vital forçada em dois pacientes (casos 5 e 14). Nos outros pacientes as funções cardíacas e respiratórias permaneceram estáveis. Até o momento não houve efeitos colaterais significativos exceto discreto aumento de peso em dois pacientes (casos 2 e 7), o que levou à redução da dose do corticóide e à resolução do problema.

A segunda forma mais encontrada em nosso estudo foi a calpainopatia, diagnosticada em cinco pacientes, 13,5% do total, através da identificação de mutações no gene CAPN3. A calpainopatia ainda parece ser a forma de LGMD mais frequente em diferentes populações ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾. No Brasil corresponde a cerca de 30% dos casos conhecidos ⁽²⁶⁾. Foi a primeira forma descrita de distrofia de cinturas causada pela deficiência de uma proteína não estrutural, a

enzima calpaína 3, que está implicada no processo de contração muscular, já que se liga fortemente à titina. Em estudo realizado por um consórcio europeu, no qual informações clínicas, quando disponíveis, e amostras de sangue de 484 pacientes de diferentes regiões demográficas foram analisadas para pesquisa de mutações no gene *CAPN3*, esta resultou positiva em aproximadamente 50% dos casos referidos ⁽¹¹²⁾. Neste mesmo estudo, observou-se que, quando utilizados critérios clínicos específicos, a correlação clínica com o achado de mutação chega a 80% dos casos. Em nosso estudo, não foi possível demonstrar pelo Western-Blot a deficiência de calpaína nos pacientes clinicamente suspeitos, devido a dificuldades na técnica. Os casos suspeitos foram submetidos à pesquisa de mutações nos exons 1, 2, 4, 5, 11 e 22 do gene *CAPN3* nos quais são encontradas mais de 80% das mutações já descritas ^(45, 111, 113, 114).

Em nosso estudo foram identificadas cinco diferentes mutações em cinco pacientes, todas previamente descritas. Três pacientes (casos 27, 28 e 29) apresentavam mutação em heterozigose composta e em dois pacientes (casos 30 e 31) somente uma mutação em um alelo foi identificada nos exons estudados. Todos os pacientes desse grupo eram do sexo feminino. Contraditoriamente, em recente *screening* de identificação de deficiência de calpaína no músculo em pacientes italianos, houve significativamente mais homens afetados (43) do que mulheres (23) ⁽¹¹⁵⁾.

A idade de início dos sintomas variou de três a 12 anos com mediana de 9 anos. Do ponto de vista clínico, nossos pacientes demonstraram um fenótipo clássico caracterizado por fraqueza muscular com envolvimento simétrico em cinturas pélvica e escapular. Em quatro dos cinco pacientes os

achados mais proeminentes foram escápula alada e retrações aquilianas. Os níveis de CK no início do quadro variaram entre 3 a 40 vezes o valor normal. A progressão da fraqueza se mostrou lenta em quatro dos cinco pacientes e moderada em uma paciente, sendo que nenhuma paciente havia perdido a marcha até a última avaliação. Não houve associação clara entre idade de início e curso clínico. As avaliações cardiológicas e respiratórias foram normais em todos os casos (Tabela 13). As pacientes gêmeas (casos 27 e 28), bivitelinas, nas quais foi detectada uma das mutações mais recorrentes na população brasileira, R110X no exon 2, apresentaram quadro clínico e evolução ligeiramente diferentes. Embora em ambas o início dos sintomas tenha sido aos 12 anos de idade, a progressão se mostrou mais rápida em uma, demonstrando que também na calpainopatia, assim como nas sarcoglicanopatias, existe uma variabilidade intrafamiliar, o que já havia sido demonstrado em outros estudos ^(111, 116). Uma das gêmeas (caso 27) apresentou quadro inicial de fraqueza proximal de predomínio nos membros inferiores, de caráter progressivo, levando a importante dificuldade na marcha. Ao exame físico apresentava escápulas aladas e hipertrofia de panturrilhas, associada a retrações aquilianas. Sua irmã (caso 28) apresenta um quadro mais leve, com discretas retrações aquilianas, escápulas aladas, mas sem hipertrofia de panturrilhas e sua força muscular mostra-se levemente diminuída. De forma interessante, ambas as pacientes mostraram, em hemogramas seriados, eosinofilia persistente, o que já foi relatado em pacientes com mutações no gene CAPN3 e miosite eosinofílica ⁽⁴⁶⁾.

Nas biópsias musculares dos casos de calpainopatia, além do padrão distrófico característico, foi encontrada a presença de fibras lobuladas em dois

pacientes (casos 27 e 30). Embora esta represente uma anormalidade inespecífica e observada em diferentes doenças neuromusculares, diversos trabalhos sugerem que sua presença é frequente na LGMD2A, quando comparada a outras formas de LGMD, sendo, portanto um achado que pode orientar o estudo molecular ^(43, 117).

Cinco pacientes (13,5%) foram classificados como LGMD2B, que juntamente com a LGMD2A, foi a segunda forma mais frequente em nosso estudo. Estudos anteriores no Brasil já haviam mostrado que a disferlinopatia é tão freqüente quanto a calpainopatia e apresenta um fenótipo discretamente mais benigno ⁽³⁴⁾. Na Itália, é a segunda mais freqüente após a forma 2A ⁽⁴¹⁾. Todos os casos de LGMD2B do nosso estudo foram pacientes do sexo feminino. A idade mediana do início dos sintomas nesse grupo foi de oito anos, semelhante à dos pacientes com LGMD2A, mas de início mais tardio em comparação à idade de início das sarcoglicanopatias 2C-F. Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que a doença pode ter início variável, desde precocemente na infância até casos de pacientes que permanecem assintomáticos até os 60-70 anos de idade, sendo que a média de idade de início, quando analisadas as formas de início em crianças e adultos, é de cerca de 20 anos ⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾. O fenótipo predominante nesta forma foi o de fraqueza proximal de predomínio nos membros inferiores, associada a atrofia distal que foi observada em três pacientes. Este padrão clínico, com acometimento da musculatura do compartimento posterior das pernas, é o mais comumente descrito nos pacientes com LGMD2B, sendo importante sinal na consideração do diagnóstico ^(16, 119, 120). Todos os casos mostraram uma evolução lenta não havendo, neste grupo de pacientes, a ocorrência de perda da marcha. Os

trabalhos mostram que a disferlinopatia apresenta uma progressão lentamente progressiva com média de idade para necessidade de cadeira de rodas aos 38 anos ⁽¹¹⁹⁾.

O nível de CK variou entre 1600-10998 U/L, com média 7400 U/L. Níveis elevados de CK não são específicos de LGMD2B, mas geralmente são vistos nos estágios iniciais da doença, podendo chegar a 50-100 vezes o valor normal. Com a evolução, os níveis de CK tendem a cair ⁽¹²⁰⁾. Na biopsia muscular foi encontrado um padrão distrófico leve, porém a característica inflamação endomisial que pode ser encontrada nesta forma da doença, foi observada em apenas um paciente (caso 19). Os trabalhos sugerem que este aspecto inflamatório pode ser mínimo nos estágios iniciais da doença, contraditoriamente aos altos níveis de CK, o que pode justificar a ausência desse achado nos nossos pacientes ⁽¹²⁰⁾. Nestes, o padrão de evolução tem se mostrado lento sem comprometimento respiratório ou cardíaco até a data da última avaliação.

Desde a sua descrição original, tem se tornado evidente que a LGMD2I é uma das formas mais comuns de LGMD em populações de adultos dos Estados Unidos, Dinamarca, Alemanha, possivelmente rivalizando com calpainopatia e disferlinopatia em frequência ⁽⁹⁰⁻⁹²⁾. No Brasil parece ser uma forma menos frequente, porém a real frequência necessita ainda ser estimada ⁽⁶²⁾. No nosso estudo, foram identificados dois pacientes (5,5% do total) com duas diferentes mutações no gene *FKRP*, assim sendo a LGMD2I a terceira forma de distrofia de cinturas de herança recessiva mais frequente. Em uma paciente (caso 25), descendente de italianos e poloneses, identificou-se a mutação *missense* em homozigose C826A levando à troca de aminoácido

p.L276I no gene do *FKRP*, sendo esta a mutação mais comumente encontrada nas populações européias⁽⁹⁰⁻⁹²⁾, diferentemente do que ocorre em populações asiáticas onde as mutações patogênicas parecem ser esporádicas⁽¹²¹⁾. Existe uma grande variabilidade clínica associada a esta mutação, desde formas leves com início tardio até formas Duchenne-like^(62, 90-92). Entretanto, esta mutação, quando em homozigose, geralmente causa um fenótipo leve com idade de início tardio e perda da marcha em idade avançada; em contraste, nesta paciente (caso 25) os primeiros sintomas surgiram já aos dois anos de idade e o curso foi rapidamente progressivo, Duchenne-like, com necessidade de cadeira de rodas devido à perda da marcha aos sete anos de idade. Hipertrofia de panturrilhas estava presente assim como retrações aquilianas. Os níveis de CK foram bastante elevados e a biopsia muscular mostrou um padrão distrófico moderado com a imunoistoquímica mostrando deficiência parcial da marcação da merosina e marcação normal das outras proteínas. Em outro paciente (caso 26) a mutação somente foi encontrada em um alelo, sendo caracterizada por uma troca de nucleotídeo 585C>T. Não foi possível identificar uma segunda mutação neste paciente, o que sugere fortemente que mutações possam existir fora da região codificadora do *FKRP*. Portanto, não temos a confirmação de que este paciente seja realmente afetado por LGMD2I; porém, os achados clínicos sugerem que sim e esta mutação 585C>T já foi previamente descrita em pacientes com LGMD2I inclusive no Brasil⁽⁶²⁾. Em nossos pacientes o envolvimento cardíaco e respiratório não foi demonstrado até a data da última avaliação, embora alguns estudos mostrem alta prevalência desta complicação que talvez possa surgir em idades mais avançadas^(62, 90-92).

A distrofia de cinturas por mutação no gene *LMNA* é uma das formas da doença de herança autossômica dominante sendo alélica da forma autossômica dominante da distrofia de Emery-Dreifuss. Os quadros clínicos das duas formas são relativamente diferentes, mas podem existir formas intermediárias entre ambas ⁽¹²²⁾. Estudos mostram que a frequência destas doenças é baixa ⁽¹²³⁾. Em nossa casuística foram encontrados dois pacientes (5,5% dos casos) com diferentes mutações no gene *LMNA*. Os pacientes apresentavam um quadro clínico intermediário entre as duas entidades sendo então diagnosticados com LGMD1B. Estes pacientes mostraram um quadro clínico com início similar, caracterizado por fraqueza de predomínio em cinturas, mas sem envolvimento úmero-peroneal, de início entre dois e três anos de idade, associada a contraturas precoces no tendão de Aquiles. Contudo, a progressão clínica entre os dois foi diferente sendo leve em um paciente (caso 24) e moderada no outro (caso 25). A biópsia muscular mostrou um padrão distrófico leve em ambos pacientes e os níveis de CK foram discretamente elevados. Em um paciente (caso 24) foi identificada uma mutação com inserção de nucleotídeo na posição 43C>CT no exon 1 levando a um stop codon nesta posição p.Q15X, sendo esta uma mutação nova. Na outra paciente (caso 25) foi identificada a mutação em heterozigose c.745T>C no exon 4 que resulta na substituição da arginina pelo triptofano (p.R249W). Neste caso os sintomas iniciaram-se aos dois anos de idade, mais precocemente do que a média da idade de início para pacientes com quadros graves de EDMD-AD (32 meses) ⁽¹²³⁾. De forma interessante, esta mesma mutação foi recentemente descrita associada à distrofia muscular congênita por deficiência de lamina A/C, de início no primeiro ano de vida ⁽¹⁵⁾.

Foram ainda diagnosticados dois pacientes (casos 21 e 22) com distrofia muscular de Emery-Dreifuss ligada ao X, identificada pela ausência de marcação da proteína nuclear emerina ao redor da membrana do núcleo. Os pacientes com a forma de distrofia de Emery-Dreifuss (EDMD) ligada ao X mostraram caracteristicamente o fenótipo composto pela tríade de contraturas em pescoço, cotovelos e aquilanas, associado a quadro de fraqueza lentamente progressiva de predomínio proximal. O risco de cardiomiopatia neste grupo de pacientes é elevado, usualmente se manifestando ao redor dos 20 anos de idade e sendo caracterizado por defeitos de condução cardíaca e bloqueio cardíaco que é a causa mais frequente de morte ⁽¹²⁴⁾. Em virtude disto, o acompanhamento cardíaco completo e frequente é mandatório, pois o implante de marcapasso precocemente pode ser essencial para uma maior sobrevida. Os pacientes realizaram avaliação cardiológica completa e até o momento não manifestaram sinais de comprometimento cardíaco. Apesar de apresentar um quadro clínico semelhante com as formas de cinturas, a distrofia de Emery-Dreifuss ligada ao X não faz parte da classificação das distrofias de cinturas e, portanto, estes pacientes não foram incluídos no cálculo para determinação das frequências.

Diante do exposto acima, torna-se evidente que realizar o diagnóstico do subtipo específico de LGMD em crianças é frequentemente um desafio, uma vez que os achados clínicos se sobrepõem e os resultados de exames habituais como o nível de CK e a histopatologia do músculo são elucidativos apenas em pequeno grupo de pacientes. Para a correta identificação do subtipo em uma criança com quadro sugestivo de LGMD é fundamental uma

completa avaliação incluindo a história familiar, modo de herança, apresentação clínica da doença, o padrão de envolvimento muscular, a associação a outros achados clínicos, além de exames complementares, particularmente o nível de CK. Posteriormente, a biópsia muscular pode ser parcialmente informativa tanto através do aspecto histológico apresentado como pelo estudo imunoistoquímico e por WB mostrando a deficiência de proteínas específicas envolvidas nas diversas formas de LGMD. É importante considerar ainda a frequência de cada subtipo de LGMD em diferentes populações uma vez que embora todas as formas sejam raras, com prevalência estimada de 1:14500 a 1:123000, algumas formas foram descritas somente em poucas famílias ou em regiões específicas.

Entretanto, nos dias atuais, o método diagnóstico padrão ouro é a detecção de mutações através de análise gênica. Utilizando todo este arsenal de ferramentas para o diagnóstico, os estudos mostram que mesmo em séries avaliadas de forma completa o diagnóstico preciso só é conseguido em cerca de 70-75% dos casos ^(18, 125).

A procura pelo diagnóstico específico através de pesquisa de mutações nos diversos genes das diferentes formas de LGMD deve sempre ser almejada principalmente para a realização de um correto aconselhamento genético e reconhecimento de possíveis complicações respiratórias e cardíacas, tais como insuficiência respiratória e cardiomiopatias, sobretudo arrítmicas, nas quais um manejo adequado pode levar a uma melhora da qualidade de vida e da sobrevida destes pacientes.

Nosso estudo a respeito da distrofia muscular de cinturas em crianças demonstra que se uma criança apresenta fenótipo de síndrome de cinturas

típico e um modo de herança autossômica recessiva, uma das formas de sarcoglicanopatia é o diagnóstico mais provável, principalmente na presença de hipertrofia de panturrilhas, escápula alada e/ou escoliose. Diferentemente da população de adultos, a LGMD2I não foi freqüente na nossa população infantil, mas mostrou um fenótipo grave e de início precoce. Já as LGMD2A e LGMD2B mostraram uma freqüência semelhante em crianças, fenótipo mais brando, início mais tardio do que as formas anteriores e uma evolução lentamente progressiva.

7 - Conclusões

7. CONCLUSÕES

- 1) O presente estudo em distrofia muscular de cinturas em crianças mostrou as seguintes frequências entre as diferentes formas: LGMD2C-F (40,5%), LGMD2A (13,5%), LGMD2B (13,5%), LGMD2I (5,5%), LGMD1B (5,5%), LGMD1C (2,5%) e em 19% não foi identificado o subtipo específico.
- 2) Clinicamente as LGMD2C-F e a LGMD2I mostraram ser as formas mais graves, com início da doença mais precoce, em geral já nos primeiros anos de vida, e curso mais agressivo muitas vezes *Duchenne-like*, podendo levar a perda da marcha poucos anos após o início da doença.
- 3) Nas sarcoglicanopatias foi frequente o encontro de hipertrofia de panturrilhas, escoliose e escápula alada.
- 4) Na LGMD2I é sugestiva a presença de hipertrofia de panturrilhas.
- 5) Nas LGMD2A e LGMD2B encontramos um quadro clínico de evolução mais branda com início, em geral, no final da primeira década, sendo frequente a presença de escápulas aladas e retrações aquilianas na LGMD2A e um padrão com envolvimento distal nos membros inferiores com atrofia dos músculos do compartimento posterior e retrações aquilianas discretas na LGMD2B.
- 6) Os níveis de CK, em geral, foram mais elevados nas disferlinopatias e nas sarcoglicanopatias quando comparados às outras formas.
- 7) A biópsia muscular mostrou um padrão distrófico mais intenso nas sarcoglicanopatias e na distrofia de cinturas por mutação do gene FKRP (LGMD2I). Na LGMD2B, a presença de inflamação não foi um achado

característico, diferentemente do encontrado em adultos. Já na LGMD2A a presença de fibras lobuladas foi o achado mais marcante.

- 8) A LGMD2I, comum em populações européias, parece ser incomum no Brasil, particularmente em crianças.

8 - Referências

8- REFERÊNCIAS

1. Dubowitz V. What is muscular dystrophy? Forty years of progressive ignorance. *J R Coll Physicians Lond*. 2000 Sep-Oct;34(5):464-8.
2. Emery AE. Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscul Disord*. 2002 May;12(4):343-9.
3. Vainzof M, Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2003 May;36(5):543-55.
4. Dubowitz V. Muscle biopsy--technical and diagnostic aspects. *Ann Clin Res*. 1974 Apr;6(2):69-79.
5. Cohn RD. Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. *Neuromuscul Disord*. 2005 Mar;15(3):207-17.
6. Mercuri E, Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet*. 2013 Mar 9;381(9869):845-60.
7. Angelini C. Limb-girdle muscular dystrophies: heterogeneity of clinical phenotypes and pathogenetic mechanisms. *Acta Myol*. 2004 Dec;23(3):130-6.
8. Kirschner J, Bonnemann CG. The congenital and limb-girdle muscular dystrophies: sharpening the focus, blurring the boundaries. *Arch Neurol*. 2004 Feb;61(2):189-99.
9. Bushby KM. Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: report of the ENMC Consortium on Limb-Girdle Dystrophies. *Neuromuscul Disord*. 1995 Jan;5(1):71-4.
10. Bonnemann CG, Finkel RS. Sarcolemmal proteins and the spectrum of limb-girdle muscular dystrophies. *Semin Pediatr Neurol*. 2002 Jun;9(2):81-99.
11. Muntoni F. Cardiomyopathy in muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*. 2003 Oct;16(5):577-83.
12. Darras BT, Jones HR. Diagnosis of pediatric neuromuscular disorders in the era of DNA analysis. *Pediatr Neurol*. 2000 Oct;23(4):289-300.

13. Takano A, Bonnemann CG, Honda H, Sakai M, Feener CA, Kunkel LM, et al. Intrafamilial phenotypic variation in limb-girdle muscular dystrophy type 2C with compound heterozygous mutations. *Muscle Nerve*. 2000 May;23(5):807-10.
14. Scharner J, Gnocchi VF, Ellis JA, Zammit PS. Genotype-phenotype correlations in laminopathies: how does fate translate? *Biochem Soc Trans*. 2010 Feb;38(Pt 1):257-62.
15. Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bonnemann CG, Jeannet PY, Colomer J, Clarke NF, et al. De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2008 Aug;64(2):177-86.
16. Nguyen K, Bassez G, Krahm M, Bernard R, Laforet P, Labelle V, et al. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol*. 2007 Aug;64(8):1176-82.
17. Paradas C, Gonzalez-Quereda L, De Luna N, Gallardo E, Garcia-Consuegra I, Gomez H, et al. A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscul Disord*. 2009 Jan;19(1):21-5.
18. Straub V, Bushby K. The childhood limb-girdle muscular dystrophies. *Semin Pediatr Neurol*. 2006 Jun;13(2):104-14.
19. Kaplan JC. The 2012 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord*. 2011 Dec;21(12):833-61.
20. Bushby KM, Beckmann JS. The 105th ENMC sponsored workshop: pathogenesis in the non-sarcoglycan limb-girdle muscular dystrophies, Naarden, April 12-14, 2002. *Neuromuscul Disord*. 2003 Jan;13(1):80-90.
21. Driss A, Amouri R, Ben Hamida C, Souilem S, Gouider-Khouja N, Ben Hamida M, et al. A new locus for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a large consanguineous Tunisian family maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscul Disord*. 2000 Jun;10(4-5):240-6.
22. Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Sertie AL, Zatz M, Passos-Bueno MR. The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *Am J Hum Genet*. 1997 Jul;61(1):151-9.

23. Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet.* 2000 Feb;24(2):163-6.
24. Passos-Bueno MR, Vainzof M, Moreira ES, Zatz M. Seven autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Brazilian population: from LGMD2A to LGMD2G. *Am J Med Genet.* 1999 Feb 19;82(5):392-8.
25. Wagner KR. Genetic diseases of muscle. *Neurol Clin.* 2002 Aug;20(3):645-78.
26. Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR. Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. *Curr Opin Neurol.* 2000 Oct;13(5):511-7.
27. Gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome only) Vol. 18 No. 1, January 2008. *Neuromuscul Disord.* 2008 Jan;18(1):101-29.
28. Hara Y, Balci-Hayta B, Yoshida-Moriguchi T, Kanagawa M, Beltran-Valero de Bernabe D, Gundesli H, et al. A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 2011 Mar 10;364(10):939-46.
29. Gundesli H, Talim B, Korkusuz P, Balci-Hayta B, Cirak S, Akarsu NA, et al. Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1f, causes autosomal-recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2010 Dec 10;87(6):834-41.
30. Durbeej M, Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev.* 2002 Jun;12(3):349-61.
31. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, Moreira ES, Pavanello RC, Marie SK, et al. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum Mol Genet.* 1996 Dec;5(12):1963-9.

32. Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnani R, Vitali A, Felisari G, et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet.* 2000 Feb;37(2):102-7.
33. Mongini T, Doriguzzi C, Bosone I, Chiado-Piat L, Hoffman EP, Palmucci L. Alpha-sarcoglycan deficiency featuring exercise intolerance and myoglobinuria. *Neuropediatrics.* 2002 Apr;33(2):109-11.
34. Passos-Bueno MR, Moreira ES, Marie SK, Bashir R, Vasquez L, Love DR, et al. Main clinical features of the three mapped autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies and estimated proportion of each form in 13 Brazilian families. *J Med Genet.* 1996 Feb;33(2):97-102.
35. Leal GF, da-Silva EO. Limb-girdle muscular dystrophy with apparently different clinical courses within sexes in a large inbred kindred. *J Med Genet.* 1999 Sep;36(9):714-8.
36. Lindberg C, Sixt C, Oldfors A. Episodes of exercise-induced dark urine and myalgia in LGMD 2I. *Acta Neurol Scand.* 2012 Apr;125(4):285-7.
37. Sandona D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:e28.
38. Haravuori H, Makela-Bengs P, Udd B, Partanen J, Pulkkinen L, Somer H, et al. Assignment of the tibial muscular dystrophy locus to chromosome 2q31. *Am J Hum Genet.* 1998 Mar;62(3):620-6.
39. Udd B. Limb-girdle type muscular dystrophy in a large family with distal myopathy: homozygous manifestation of a dominant gene? *J Med Genet.* 1992 Jun;29(6):383-9.
40. Udd B, Kaarianen H, Somer H. Muscular dystrophy with separate clinical phenotypes in a large family. *Muscle Nerve.* 1991 Nov;14(11):1050-8.
41. Guglieri M, Magri F, D'Angelo MG, Prella A, Morandi L, Rodolico C, et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat.* 2008 Feb;29(2):258-66.

42. van der Kooi AJ, Frankhuizen WS, Barth PG, Howeler CJ, Padberg GW, Spaans F, et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the Netherlands: gene defect identified in half the families. *Neurology*. 2007 Jun 12;68(24):2125-8.
43. Fanin M, Nardetto L, Nascimbeni AC, Tasca E, Spinazzi M, Padoan R, et al. Correlations between clinical severity, genotype and muscle pathology in limb girdle muscular dystrophy type 2A. *J Med Genet*. 2007 Oct;44(10):609-14.
44. Fanin M, Nascimbeni AC, Angelini C. Screening of calpain-3 autolytic activity in LGMD muscle: a functional map of CAPN3 gene mutations. *J Med Genet*. 2007 Jan;44(1):38-43.
45. Fanin M, Fulizio L, Nascimbeni AC, Spinazzi M, Piluso G, Ventriglia VM, et al. Molecular diagnosis in LGMD2A: mutation analysis or protein testing? *Hum Mutat*. 2004 Jul;24(1):52-62.
46. Krahm M, Lopez de Munain A, Streichenberger N, Bernard R, Pecheux C, Testard H, et al. CAPN3 mutations in patients with idiopathic eosinophilic myositis. *Ann Neurol*. 2006 Jun;59(6):905-11.
47. Bejaoui K, Hirabayashi K, Hentati F, Haines JL, Ben Hamida C, Belal S, et al. Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. *Neurology*. 1995 Apr;45(4):768-72.
48. Vainzof M, Anderson LV, McNally EM, Davis DB, Faulkner G, Valle G, et al. Dysferlin protein analysis in limb-girdle muscular dystrophies. *J Mol Neurosci*. 2001 Aug;17(1):71-80.
49. Weiler T, Greenberg CR, Nylen E, Halliday W, Morgan K, Eggertson D, et al. Limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy in an aboriginal Canadian kindred map to LGMD2B and segregate with the same haplotype. *Am J Hum Genet*. 1996 Oct;59(4):872-8.
50. Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol*. 2001 Jan;49(1):130-4.

51. Soares CN, de Freitas MR, Nascimento OJ, da Silva LF, de Freitas AR, Werneck LC. Myopathy of distal lower limbs: the clinical variant of Miyoshi. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003 Dec;61(4):946-9.
52. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1998 Sep;20(1):31-6.
53. Ro LS, Lee-Chen GJ, Lin TC, Wu YR, Chen CM, Lin CY, et al. Phenotypic features and genetic findings in 2 chinese families with Miyoshi distal myopathy. *Arch Neurol*. 2004 Oct;61(10):1594-9.
54. Guglieri M, Magri F, Comi GP. Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: boundaries and contiguities. *Clin Chim Acta*. 2005 Nov;361(1-2):54-79.
55. McNally EM, Ly CT, Rosenmann H, Mitrani Rosenbaum S, Jiang W, Anderson LV, et al. Splicing mutation in dysferlin produces limb-girdle muscular dystrophy with inflammation. *Am J Med Genet*. 2000 Apr 10;91(4):305-12.
56. Vainzof M, Moreira ES, Suzuki OT, Faulkner G, Valle G, Beggs AH, et al. Telethonin protein expression in neuromuscular disorders. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Oct 9;1588(1):33-40.
57. Frosk P, Weiler T, Nylen E, Sudha T, Greenberg CR, Morgan K, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet*. 2002 Mar;70(3):663-72.
58. Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet*. 2001 Dec;69(6):1198-209.
59. Brockington M, Blake DJ, Brown SC, Muntoni F. The gene for a novel glycosyltransferase is mutated in congenital muscular dystrophy MDC1C and limb girdle muscular dystrophy 2I. *Neuromuscul Disord*. 2002 Mar;12(3):233-4.

60. Mercuri E, Brockington M, Straub V, Quijano-Roy S, Yuva Y, Herrmann R, et al. Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Ann Neurol*. 2003 Apr;53(4):537-42.
61. Schwartz M, Hertz JM, Sveen ML, Vissing J. LGMD2I presenting with a characteristic Duchenne or Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology*. 2005 May 10;64(9):1635-7.
62. de Paula F, Vieira N, Starling A, Yamamoto LU, Lima B, de Cassia Pavanello R, et al. Asymptomatic carriers for homozygous novel mutations in the FKRPF gene: the other end of the spectrum. *Eur J Hum Genet*. 2003 Dec;11(12):923-30.
63. Dincer P, Balci B, Yuva Y, Talim B, Brockington M, Dincel D, et al. A novel form of recessive limb girdle muscular dystrophy with mental retardation and abnormal expression of alpha-dystroglycan. *Neuromuscul Disord*. 2003 Dec;13(10):771-8.
64. Balci B, Uyanik G, Dincer P, Gross C, Willer T, Talim B, et al. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscul Disord*. 2005 Apr;15(4):271-5.
65. Bolduc V, Marlow G, Boycott KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J, et al. Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *Am J Hum Genet*. 2010 Feb 12;86(2):213-21.
66. Jarry J, Rioux MF, Bolduc V, Robitaille Y, Khoury V, Thiffault I, et al. A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12. *Brain*. 2007 Feb;130(Pt 2):368-80.
67. Hicks D, Sarkozy A, Muelas N, Koehler K, Huebner A, Hudson G, et al. A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy. *Brain*. 2011 Jan;134(Pt 1):171-82.
68. Godfrey C, Escolar D, Brockington M, Clement EM, Mein R, Jimenez-Mallebrera C, et al. Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2006 Nov;60(5):603-10.

69. Biancheri R, Falace A, Tessa A, Pedemonte M, Scapolan S, Cassandrini D, et al. POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 30;363(4):1033-7.
70. Clement EM, Godfrey C, Tan J, Brockington M, Torelli S, Feng L, et al. Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. *Arch Neurol*. 2008 Jan;65(1):137-41.
71. Penisson-Besnier I, Talvinen K, Dumez C, Vihola A, Dubas F, Fardeau M, et al. Myotilinopathy in a family with late onset myopathy. *Neuromuscul Disord*. 2006 Jul;16(7):427-31.
72. Gilchrist JM, Pericak-Vance M, Silverman L, Roses AD. Clinical and genetic investigation in autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology*. 1988 Jan;38(1):5-9.
73. Olive M, Goldfarb LG, Shatunov A, Fischer D, Ferrer I. Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype. *Brain*. 2005 Oct;128(Pt 10):2315-26.
74. Hauser MA, Conde CB, Kowaljow V, Zeppa G, Taratuto AL, Torian UM, et al. myotilin Mutation found in second pedigree with LGMD1A. *Am J Hum Genet*. 2002 Dec;71(6):1428-32.
75. Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, et al. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet*. 2000 May 22;9(9):1453-9.
76. van der Kooi AJ, van Meegen M, Ledderhof TM, McNally EM, de Visser M, Bolhuis PA. Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11-21. *Am J Hum Genet*. 1997 Apr;60(4):891-5.
77. Decostre V, Ben Yaou R, Bonne G. Laminopathies affecting skeletal and cardiac muscles: clinical and pathophysiological aspects. *Acta Myol*. 2005 Oct;24(2):104-9.

78. Miller RG, Layzer RB, Mellenthin MA, Golabi M, Francoz RA, Mall JC. Emery-Dreifuss muscular dystrophy with autosomal dominant transmission. *Neurology*. 1985 Aug;35(8):1230-3.
79. Wessely R, Seidl S, Schomig A. Cardiac involvement in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Clin Genet*. 2005 Mar;67(3):220-3.
80. Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, Macioce P, et al. Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem*. 2000 Dec 1;275(48):38048-58.
81. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, et al. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*. 1999 Nov;19(11):7289-304.
82. Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, et al. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1998 Apr;18(4):365-8.
83. Betz RC, Schoser BG, Kasper D, Ricker K, Ramirez A, Stein V, et al. Mutations in CAV3 cause mechanical hyperirritability of skeletal muscle in rippling muscle disease. *Nat Genet*. 2001 Jul;28(3):218-9.
84. Hackman P, Sandell S, Sarparanta J, Luque H, Huovinen S, Palmio J, et al. Four new Finnish families with LGMD1D; refinement of the clinical phenotype and the linked 7q36 locus. *Neuromuscul Disord*. 2011 May;21(5):338-44.
85. Norwood F, de Visser M, Eymard B, Lochmuller H, Bushby K. EFNS guideline on diagnosis and management of limb girdle muscular dystrophies. *Eur J Neurol*. 2007 Dec;14(12):1305-12.
86. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215.

87. Gouveia TL, Paim JF, Pavanello RC, Zatz M, Vainzof M. Sarcoglycanopathies: a multiplex molecular analysis for the most common mutations. *Diagn Mol Pathol*. 2006 Jun;15(2):95-100.
88. Bushby KM, Beckmann JS. The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord*. 1995 Jul;5(4):337-43.
89. Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet*. 2001 Dec 1;10(25):2851-9.
90. Walter MC, Petersen JA, Stucka R, Fischer D, Schroder R, Vorgerd M, et al. FKRP (826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Med Genet*. 2004 Apr;41(4):e50.
91. Kang PB, Feener CA, Estrella E, Thorne M, White AJ, Darras BT, et al. LGMD2I in a North American population. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007;8:115.
92. Sveen ML, Schwartz M, Vissing J. High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol*. 2006 May;59(5):808-15.
93. Rosales XQ, Tsao CY. Childhood onset of limb-girdle muscular dystrophy. *Pediatr Neurol*. 2012 Jan;46(1):13-23.
94. Zatz M, de Paula F, Starling A, Vainzof M. The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord*. 2003 Sep;13(7-8):532-44.
95. Guglieri M, Straub V, Bushby K, Lochmuller H. Limb-girdle muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*. 2008 Oct;21(5):576-84.
96. Nalini A, Gayathri N, Thaha F, Das S, Shylashree S. Sarcoglycanopathy: clinical and histochemical characteristics in 66 patients. *Neurol India*. 2010 Sep-Oct;58(5):691-6.
97. Schara U, Gencik M, Mortier J, Langen M, Gencikova A, Epplen JT, et al. Alpha-sarcoglycanopathy previously misdiagnosed as Duchenne muscular

dystrophy: implications for current diagnostics and patient care. *Eur J Pediatr*. 2001 Jul;160(7):452-3.

98. Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C, et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Oct;65(10):995-1003.

99. Ginjaar HB, van der Kooi AJ, Ceelie H, Kneppers AL, van Meegen M, Barth PG, et al. Sarcoglycanopathies in Dutch patients with autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *J Neurol*. 2000 Jul;247(7):524-9.

100. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Marie SK, Oliveira AS, Zatz M. Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J Neurol Sci*. 1999 Mar 15;164(1):44-9.

101. Ferreira AF, Carvalho MS, Resende MB, Wakamatsu A, Reed UC, Marie SK. Phenotypic and immunohistochemical characterization of sarcoglycanopathies. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(10):1713-9.

102. Duggan DJ, Fanin M, Pegoraro E, Angelini C, Hoffman EP. alpha-Sarcoglycan (adhalin) deficiency: complete deficiency patients are 5% of childhood-onset dystrophin-normal muscular dystrophy and most partial deficiency patients do not have gene mutations. *J Neurol Sci*. 1996 Sep 1;140(1-2):30-9.

103. Moreira ES, Vainzof M, Suzuki OT, Pavanello RC, Zatz M, Passos-Bueno MR. Genotype-phenotype correlations in 35 Brazilian families with sarcoglycanopathies including the description of three novel mutations. *J Med Genet*. 2003 Feb;40(2):E12.

104. Crosbie RH, Lim LE, Moore SA, Hirano M, Hays AP, Maybaum SW, et al. Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum Mol Genet*. 2000 Aug 12;9(13):2019-27.

105. Bonnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sa Moreira E, Marie SK, et al. Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Hum Mol Genet*. 1996 Dec;5(12):1953-61.

106. Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, Alman B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul Disord*. 2006 Apr;16(4):249-55.
107. Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008(1):CD003725.
108. Parreira SL, Resende MB, Zanoteli E, Carvalho MS, Marie SK, Reed UC. Comparison of motor strength and function in patients with Duchenne muscular dystrophy with or without steroid therapy. *Arq Neuropsiquiatr*. 2010 Oct;68(5):683-8.
109. Dincer P, Leturcq F, Richard I, Piccolo F, Yalnizoglu D, de Toma C, et al. A biochemical, genetic, and clinical survey of autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies in Turkey. *Ann Neurol*. 1997 Aug;42(2):222-9.
110. Richard I, Brenguier L, Dincer P, Roudaut C, Bady B, Burgunder JM, et al. Multiple independent molecular etiology for limb-girdle muscular dystrophy type 2A patients from various geographical origins. *Am J Hum Genet*. 1997 May;60(5):1128-38.
111. de Paula F, Vainzof M, Passos-Bueno MR, de Cassia MPR, Matioli SR, L VBA, et al. Clinical variability in calpainopathy: what makes the difference? *Eur J Hum Genet*. 2002 Dec;10(12):825-32.
112. Saenz A, Leturcq F, Cobo AM, Poza JJ, Ferrer X, Otaegui D, et al. LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain*. 2005 Apr;128(Pt 4):732-42.
113. Piluso G, Politano L, Aurino S, Fanin M, Ricci E, Ventriglia VM, et al. Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes. *J Med Genet*. 2005 Sep;42(9):686-93.
114. Krahn M, Bernard R, Pecheux C, Hammouda el H, Eymard B, Lopez de Munain A, et al. Screening of the CAPN3 gene in patients with possible LGMD2A. *Clin Genet*. 2006 May;69(5):444-9.

115. Fanin M, Pegoraro E, Matsuda-Asada C, Brown RH, Jr., Angelini C. Calpain-3 and dysferlin protein screening in patients with limb-girdle dystrophy and myopathy. *Neurology*. 2001 Mar 13;56(5):660-5.
116. Schessl J, Walter MC, Schreiber G, Schara U, Muller CR, Lochmuller H, et al. Phenotypic variability in siblings with calpainopathy (LGMD2A). *Acta Myol*. 2008 Oct;27:54-8.
117. Luo SS, Xi JY, Lu JH, Zhao CB, Zhu WH, Lin J, et al. Clinical and pathological features in 15 Chinese patients with calpainopathy. *Muscle Nerve*. 2011 Mar;43(3):402-9.
118. Klinge L, Aboumoussa A, Eagle M, Hudson J, Sarkozy A, Vita G, et al. New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Sep;81(9):946-53.
119. Rosales XQ, Gastier-Foster JM, Lewis S, Vinod M, Thrush DL, Astbury C, et al. Novel diagnostic features of dysferlinopathies. *Muscle Nerve*. 2010 Jul;42(1):14-21.
120. Urtizberea JA, Bassez G, Leturcq F, Nguyen K, Krahn M, Levy N. Dysferlinopathies. *Neurol India*. 2008 Jul-Sep;56(3):289-97.
121. Hong D, Zhang W, Wang W, Wang Z, Yuan Y. Asian patients with limb girdle muscular dystrophy 2I (LGMD2I). *J Clin Neurosci*. 2011 Apr;18(4):494-9.
122. Ki CS, Hong JS, Jeong GY, Ahn KJ, Choi KM, Kim DK, et al. Identification of lamin A/C (LMNA) gene mutations in Korean patients with autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy and limb-girdle muscular dystrophy 1B. *J Hum Genet*. 2002;47(5):225-8.
123. Vytopil M, Benedetti S, Ricci E, Galluzzi G, Dello Russo A, Merlini L, et al. Mutation analysis of the lamin A/C gene (LMNA) among patients with different cardiomyopathic phenotypes. *J Med Genet*. 2003 Dec;40(12):e132.
124. Astejada MN, Goto K, Nagano A, Ura S, Noguchi S, Nonaka I, et al. Emerinopathy and laminopathy clinical, pathological and molecular features of muscular dystrophy with nuclear envelopathy in Japan. *Acta Myol*. 2007 Dec;26(3):159-64.

125. Bushby K. Diagnosis and management of the limb girdle muscular dystrophies. *Pract Neurol*. 2009 Dec;9(6):314-23.

Anexo A- Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:

.....
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:

Nº APTO: BAIRRO.....

CIDADE:ESTADO:.....

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....

2.RESPONSÁVEL LEGAL

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:

Nº APTO: BAIRRO.....

CIDADE:ESTADO:.....

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Caracterização clínica-imunohistoquímica da distrofia muscular tipo cinturas em crianças e análise molecular do gene FKRP

PESQUISADOR: Umbertina Conti Reed **CARGO/FUNÇÃO:** médica

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N° CRM-SP: 17145

UNIDADE DO HCFMUSP: Neurologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO -	RISCO MÉDIO	X
RISCO BAIXO	-	RISCO MAIOR -

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

A fim de identificar qual o tipo distrofia muscular que seu filho (a) apresenta, além da biópsia muscular, é necessário analisar no material da biópsia as proteínas musculares porque cada tipo de distrofia é causado pela alteração de uma proteína diferente. Quando não se consegue identificar a proteína alterada no material da biópsia, é feito um exame do sangue obtido de uma veia a fim de analisar o DNA da proteína FKRP, que é uma das mais freqüentemente alteradas no caso da distrofia de cinturas apresentada pelo seu filho(a). Esta coleta é feita por uma equipe especializada onde são coletados 10 ml de sangue que serão armazenados para este estudo. Seu filho (a) será submetido à realização de biópsia muscular sob anestesia, sendo retirado um pequeno fragmento de músculo do braço. Este é um procedimento simples a ser realizado sob anestesia geral mas que pode trazer algum desconforto após sua realização como dor no local da biópsia, hematoma no local mas que são

bem controlados com medidas simples como uso de analgésicos comuns . Tanto a biópsia como a coleta do sangue serão realizados por equipe especializada com riscos mínimos para o paciente. Este estudo trará para seu filho(a) o benefício de conhecer com exatidão o tipo de distrofia que ele(a) apresenta para podermos tratar adequadamente e oferecer informações sobre o como vai ser a evolução da doença e o risco de repetição, caso desejem ter outros filhos.

Em qualquer etapa do estudo, o Sr(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Umbertina Conti Reed que pode ser encontrado no endereço *Av. Dr.Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Cerqueira César, São Paulo, Prédio dos Ambulatórios, 6º andar*, telefone (11) 30696000, ramal 6341 e na sua sala 5131, quinto andar do Instituto Central, telefone (11) 30697878, das 7 às 16 horas de 2ª a 5ª feira, das 7 às 16 horas, e às 6ªs feiras, das 7 às 12 horas. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas pelos pesquisadores em conjunto com aquelas de todos os demais pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

O Sr (a) tem o direito de ser mantido (a) atualizado (a) sobre os resultados parciais e final da pesquisa que neste caso corresponde ao diagnóstico do tipo de distrofia muscular. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira

relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo Caracterização clínica-imunohistoquímica da distrofia muscular tipo cinturas em crianças e análise molecular do gene FKRP.

Eu discuti com o Dra Umbertina Conti Reed sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo B - Aprovação pelo comitê de ética

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/06/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0209/09**, intitulado: **"CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA-IMUNOHISTOQUÍMICA DA DISTROFIA MUSCULAR TIPO CINTURAS EM CRIANÇAS E ANÁLISE DE MUTAÇÕES DO GENE FKRP"** apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Umbertina Conti Reed**

Pesquisador (a) Executante: **Marco Antônio Veloso de Albuquerque**

CAPPesq, 04 de Junho de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Apêndice 1 - Artigo submetido à revista *BMC Neurology* em 10/07/2013

MS: 3732156921031433

Steroid therapy in children with sarcoglycanopathies

Marco AV Albuquerque, Edmar Zanoteli, Jessica R Maximino, Gerson Chadi and
Umbertina C Reed
BMC Neurology

Dear Dr ALBUQUERQUE

Thank you for your recent submission to BMC Neurology. I would like to update you regarding your status with respect to the article processing charge that is normally due if a manuscript is accepted.

Steroid therapy in children with sarcoglycanopathies

Marco Antonio V Albuquerque, Edmar Zanoteli, Jéssica R Maximino, Gerson Chadi, Umbertina Conti Reed.

Department of Neurology, University of São Paulo, São Paulo/Brazil

Abstract**Background**

Sarcoglycanopathies (SGs) comprise four subtypes of autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies (LGMD) that are caused by mutations in sarcoglycan complex. Patients with sarcoglycanopathies typically present the first symptoms in the first decade of life with progressive weakness leading to early loss of ambulation and premature death due to cardiomyopathy or respiratory insufficiency. Beside of a rehabilitation program, there is no effective treatment for these patients. The aim of this study was to describe the beneficial effect of steroid therapy in retarding the functional strength loss in six nonrelated patients with sarcoglycanopathy.

Methods

Six children attending the Outpatient Child Neurology Service for neuromuscular disorders at our Institution were included in the present study.

All of them had clinical and laboratory findings compatible with the diagnosis of LGMD. Treatment with steroids, prednisolone on intermittent regimen (10 days on and 10 days off) at a dose of 1 mg/kg/day, or deflazacort daily at a dose of 0.9 mg/kg/day, was initiated at the moment that a rapid and marked decrease of muscle strength was noted and offered them for a period of time that ranged of 12 to 48 months. We analyzed the muscle strength, cardiologic and respiratory function immediately before the onset of the treatment and after a period of treatment.

Results

After one year (cases 3, 4 and 5), two years (cases 2 and 6) and 4 years of treatment (case 1), it was observed a stabilization in the muscular strength in patient 6, a slight improvement in patients 1 and 2, and a slight worsening of the muscle strength in patient 3, 4 and 5; Although this variable response steroids, no patient lost the ability to walk during the treatment period. In addition, CVF in repeated pulmonary function tests showed a stable value in three children (cases 2, 3 and 6), mild improvement in two (cases 1 and 4) and in only one child there was a reduction of CVF from 58% to 52% (case 5). On cardiac examination, two children had a mild improvement of the ejection ventricular fraction (cases 1 and 5) and one child (case 3) had a mild worsening. In the other patients the cardiac function remained stable during the follow-up. Side effects are minimal, except a mild increase in body weight in two patients.

Conclusions

Even considering the reduced number of patients we concluded that steroids might be a potential therapy to alleviate the progression of muscle function loss in a subgroup of patients with sarcoglycanopathies.